



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Identificación de genes de toxinas en cepas de  
*Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes con  
periodontitis”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**B I Ó L O G A**

**PRESENTA:**  
**Alanis Saucedo Jesica Carina**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**Dr. Sergio Vaca Pacheco**

**Proyecto financiado por la UNAM-FES Iztacala (FESI-DIP-  
PAPCA-2016-26).**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De Méx. 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*A mi mamá:*

*Una gran mujer que con esfuerzo, amor, paciencia y dedicación ha hecho de mí una gran persona. Gracias por todo tu apoyo incondicional. Te amo.*

*A mi papá:*

*El hombre más importante en mi vida, gracias por tus consejos, amor, palabras de aliento y apoyo. Te amo.*

*A mis hermanos:*

*Por su compañía, apoyo y cariño que me brindan todo el tiempo. Los amo mucho.*

*A todos los que creyeron en mí y me apoyaron. Gracias por todo.*

*&... especialmente a mí por siempre dar lo mejor.*

# Agradecimientos

*Estas líneas significan una pequeña parte de todo mi infinito agradecimiento a todos aquellos que me brindaron su apoyo para concluir esta gran etapa en mi vida.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a la FES Iztacala por permitirme formar parte de ella para lograr mi formación como Bióloga.*

*A mi Director de Tesis: Dr. Sergio Vaca Pacheco por brindarme confianza, consejos y apoyo, por el tiempo y correcciones realizadas para culminar mi tesis.*

*A mis sinodales de tesis:*

*Dra. Gloria Luz Paniagua por haber compartido conmigo sus cultos conocimientos y sabios consejos, le agradezco por su comprensión y en especial por confiar en mi al recibirme con las puertas abiertas del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI.*

*Dr. Eric Monroy gracias por sus enseñanzas, sus excelentes asesorías y sobre todo por brindarme toda la paciencia, tiempo y dedicación para guiarme durante el desarrollo de la tesis. Muchas gracias por todo lo bueno que aprendí de usted.*

*M. en C. Alina Uribe por ser mi compañera en el Laboratorio, así como sus valiosas observaciones para concluir este trabajo. A lo largo de este tiempo se ha ganado mi admiración, respeto y mi amistad.*

*Biól. Susana Esther González por haberme instruido con las bases necesarias en el laboratorio, por tu dedicación en tiempo, paciencia y ayuda, así como por tus observaciones en este trabajo.*

*En mi vida como estudiante me he relacionado con varios maestros y compañeros... sin embargo ustedes representan una gran influencia en mi vida profesional y personal, siempre estarán en mi corazón.*

***¡Gracias por su dedicación y compromiso!***

# Índice

<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1 Características de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
1.2 Factores de virulencia y patogenicidad.....	7
1.3 Enfermedad periodontal .....	15
1.4 Mecanismo de resistencia a la meticilina de <i>S. aureus</i> .....	16
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>18</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 General.....	20
4.2 Particulares.....	20
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>21</b>
5.1 Toma de muestras.....	21
5.2 Identificación de <i>S. aureus</i> por pruebas bioquímicas .....	22
5.3 Pruebas moleculares .....	23
5.3.1 Extracción de DNA .....	23
5.3.2 Identificación de <i>S. aureus</i> por PCR.....	23
5.3.3 Identificación de genes de toxinas de <i>S. aureus</i> por PCR.....	25
5.3.4 Identificación de otros factores de virulencia de <i>S. aureus</i> por PCR.....	27
5.3.5 Identificación del gen de adhesina <i>icaA</i> de <i>S. aureus</i> por PCR.....	28
5.3.6 Detección del gen <i>mecA</i> en <i>S. aureus</i> .....	28
5.4 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa .....	29
5.5 Susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby Bauer .....	30

<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
6.1 Pacientes estudiados.....	31
6.2 Identificación bacteriana.....	33
6.3 Identificación de <i>S. aureus</i> .....	34
6.4 Identificación de genes que codifican toxinas y otros factores de virulencia en las cepas de <i>S. aureus</i> .....	35
6.5 Detección del gen <i>mecA</i> .....	39
6.6 Resistencia a los antibióticos .....	40
6.7 Diferentes patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas de <i>S. aureus</i> .....	42
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
7.1 Pacientes estudiados.....	43
7.2 Identificación de microorganismos asociados a enfermedad periodontal. ....	44
7.3 Identificación de <i>S. aureus</i> .....	45
7.4 Identificación de genes que codifican enterotoxinas .....	46
7.5 Identificación de genes que codifican toxinas exfoliativas y la toxina del síndrome del shock tóxico .....	47
7.6 Identificación de genes que codifican otros factores de virulencia .....	47
7.7 Identificación del operón <i>ica</i> que codifica para la biopelícula.....	48
7.8 Detección del gen <i>mecA</i> en cepas de <i>S. aureus</i> .....	49
7.9 Resistencia a los antibióticos .....	50
7.10 Patrones de asociación de los genes de virulencia y de <i>mecA</i> en las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de infección periodontal .....	51
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

La periodontitis es una infección causada por diferentes microorganismos, entre los que se encuentra *Staphylococcus aureus*. La periodontitis genera con el tiempo la pérdida progresiva del hueso alveolar alrededor de los dientes, lo que conduce al aflojamiento y a la subsecuente pérdida de los dientes. El propósito de este trabajo fue determinar la frecuencia de los genes de toxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* (staphylococcal enterotoxins); *tst* (toxic shock syndrome toxin 1); *eta*, *etb* (exfoliative toxins A y B), así como de los genes *chp* (chemotaxis inhibitory protein); *v8* (serine protease); *arcA* (arginine deiminase) e *icaA* (intercellular-adhesion cluster) en un grupo de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con periodontitis. Se analizaron 268 cepas de *S. aureus* obtenidas de pacientes con infección periodontal de la Clínica de Endoperiodontología de la FES-Iztacala, UNAM. Las cepas de *S. aureus* fueron identificadas por las pruebas bioquímicas de la fermentación en manitol y la técnica de la coagulasa en plasma; y por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) mediante la amplificación de los genes cromosómicos rRNA, *spa*, *nuc* y *coa*. Los genes de toxinas fueron identificados por PCR multiplex, y *mecA* y los otros marcadores de virulencia por PCR convencional. Se identificaron 18.7% (n=50) cepas de *S. aureus*. Los genes *mecA* y *v8* se identificaron en el 100% de las cepas; *icaA* en el 98% (n=49); seguido de *seg* en 92% (n=46), *arcA* 72% (n=36), *sei* en 60% (n=30), *chp* en el 60% (n=30), *see* en 28% (n=14), *eta* en 20% (n=10), *sea* en 10% (n=5). Finalmente *tst* y *sed* en 4% (n=2) cada uno. Los genes *seb*, *sec*, *seh*, *sej* y *etb* no fueron detectados en las cepas de *S. aureus*. Una frecuencia alta de las cepas mostró resistencia a los antibióticos probados, en su mayoría a los  $\beta$ -lactámicos. Los resultados mostraron la asociación de genotipos de virulencia involucrados en la adhesión celular, producción de toxinas e inhibición de la respuesta inmune en las cepas de *S. aureus* (*mecA*+) provenientes de infecciones periodontales, sugiriendo la capacidad de las cepas para provocar infecciones más graves en los pacientes estudiados.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, *spa*, enfermedad periodontal, toxinas, otros factores de virulencia.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características de *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* es una bacteria perteneciente a la familia *Micrococcaceae* del género *Staphylococcus*, dicho término fue introducido por Ogston para hacer referencia a los cocos responsables de la inflamación y la supuración (Ogston, 1881). *S. aureus* es un coco Grampositivo que crece en forma de racimos de uvas, tiene un diámetro de 0.1-1  $\mu\text{m}$ , es anaerobio facultativo, es inmóvil, no forma esporas, crece bien en un rango de pH de 4.8 a 9.4 y a temperaturas entre 25°C y 43°C. Es resistente a la desecación, capaz de crecer en medios con elevada concentración de sal como el agar S-110. Sus colonias miden de 1 a 3 mm, son lisas, elevadas, brillantes, tienen una pigmentación amarilla-dorada debido a la presencia de carotenoides, sin embargo se presentan frecuentemente variantes no pigmentadas en muchas cepas (Velázquez, 2005).

*S. aureus* puede identificarse en el laboratorio empleando la tinción de Gram; por diversas pruebas bioquímicas como: la técnica de la coagulasa en placa y la fermentación del manitol; y por pruebas moleculares como la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) mediante la detección de diversos marcadores cromosómicos como son los genes 23S rRNA, *spa* (región X), *coa* y *nuc* (Nashev *et al.*, 2004; Cervantes *et al.*, 2014).

## 1.2 Factores de virulencia y patogenicidad

*S. aureus* se aísla frecuentemente de personas en la comunidad y de infecciones nosocomiales. Se estima que entre 20% y 50% de la población mundial es portadora asintomática de *S. aureus* en las fosas nasales y 30% de forma permanente en la piel y el tracto gastrointestinal (Cervantes *et al.*, 2014); sin embargo, esta bacteria es oportunista y cuando las defensas del hospedero se ven comprometidas, causa una amplia gama de enfermedades, que van desde procesos banales (infecciones leves y abscesos en la piel) hasta infecciones graves en piel y en tejidos blandos que comprometen la vida del paciente, tales como: síndromes y enfermedades crónicas, teniendo acceso a otras partes del cuerpo a través de heridas, lo que le permite acceder al tejido y provocar lesiones locales. En casos



más extremos puede distribuirse en el cuerpo por medio del torrente sanguíneo (Velázquez, 2005; Álvarez & Ponce, 2012).

Durante varias décadas, el análisis molecular y genético de *S. aureus* ha revelado la presencia de adhesinas de superficie que median la adherencia y la colonización de las células blanco, la secreción de enzimas y toxinas (Cuadro 1), responsables de la invasión y de ser la causa de enfermedades distantes del foco inicial (Cervantes *et al.*, 2014).

**Cuadro 1.** Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* (Modificado de Bustos *et al.*, 2006).

Estructurales	Enzimas	Toxinas	Otros factores
- MSCRAMMs	- Coagulasa	- Toxinas exfoliativas A y B	- Vía de la arginina deiminasa
- Ácido lipoteicoico	- Catalasa		
- Peptidoglucano	- Estafiloquinasa	- Toxina del Síndrome de	
- Ácido teicoico	- Hialuronidasa	shock tóxico	- Serin proteasa V8
- Proteína A	- Lipasa		
- Cápsula	- Fosfolipasa C	- Enterotoxinas (A-E y G-J)	- Proteína inhibidora de la quimiotaxis
	- Nucleasas		
	- Hemolisinas $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ y $\delta$		
	- Leucocidina de PV		

Estructuralmente *S. aureus* posee proteínas de superficie, denominadas «moléculas adhesivas de matriz que reconocen componentes de superficie microbiana» (MSCRAMMs, por sus siglas en inglés), las cuales están unidas de forma covalente al peptidoglucano de la pared celular de la bacteria (Perkins *et al.*, 2001; Castañón, 2012). Estas proteínas reconocen receptores en moléculas de colágeno, fibronectina, fibrinógeno y sialoproteínas, mediando la adherencia a los tejidos del hospedero con lo que se inicia la colonización; además, estas bacterias secretan enzimas que conducen al establecimiento de una infección al degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en sus nutrientes; también pueden causar daños celulares por medio de toxinas (Mazmanian *et al.*, 2001; O'Neill *et al.*, 2008).

En *S. aureus*, la pared celular le confiere tolerancia osmótica y tiene importantes propiedades biológicas como actividad endotóxica, desencadena la producción de interleucina-1 por los monocitos, estimula la quimiotaxis y la agregación de los leucocitos, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes, además representa la mitad del peso seco de la bacteria. La pared celular está compuesta por ácido lipoteicoico y peptidoglucano. El ácido lipoteicoico juega un papel en la adherencia ya que está unido a la membrana plasmática, está involucrado en la inflamación y en la liberación de citocinas por los macrófagos y otras moléculas del sistema inmune; mientras que el peptidoglucano está compuesto por cadenas de ácido N-acetilmurámico, N-acetilglucosamina y de subunidades de disacáridos; la parte covalente del peptidoglucano se une a las proteínas con función de adhesinas (Cervantes *et al.*, 2014).

Por otro lado están los ácidos teicoicos o polisacáridos A, representan más del 50% del peso seco purificado de las paredes de los estafilococos. Los ácidos teicoicos están constituidos por polímeros de ribitol fosfato entrecruzados con N-acetilglucosamina, son específicos de especie, pueden estar unidos covalentemente al peptidoglucano de la pared celular y ligados a los lípidos de la membrana citoplasmática. Los ácidos teicoicos juegan un papel fisiológico importante en el metabolismo de la pared celular. Su función es mediar la unión de los estafilococos a las superficies de las mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. Tienen además la capacidad de inducir la producción de anticuerpos (Cervantes *et al.*, 2014).

Además la pared celular de *S. aureus* posee una proteína característica llamada Proteína A codificada por el gen *spa*. La función más importante de esta proteína es llevar a cabo el reconocimiento y la unión de la fracción Fc de las inmunoglobulinas G para disminuir la opsonización, activando el complemento dando lugar a reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía, por lo tanto, limita el proceso de fagocitosis. Existen reportes que demuestran que la Proteína A es capaz de unirse al factor Von Willebrand, una proteína presente en el sitio de daño a endotelios y por tal motivo puede tener un papel importante en la adherencia y en la inducción de enfermedad endovascular (Hartleib *et al.*, 2000).

Algunas cepas de *S. aureus* cuentan con un factor importante para la patogenicidad, es la capa polisacárida extracelular denominada *slime* o cápsula mucoide, compuesta de un

polímero de N-acetil glucosamina (PNAG), también referido como *Polisacárido de Adhesión Intercelular* (PIA, por sus siglas en inglés), para formar biopelículas. Dicha red extracelular ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies, a colonizar y prolongar la infección en catéteres, prótesis y sondas, además de proteger a las bacterias de la fagocitosis, así como de los antibióticos. El responsable de codificar dicha maquinaria para la síntesis del polímero es el operón *ica*; sin embargo, no todas las cepas poseen dicho elemento genético. Es por este hecho que el PIA se considera el responsable de muchas infecciones recurrentes y resistentes a la respuesta inmune del hospedero (Watts *et al.*, 2005; O'Gara, 2007).

Las enzimas secretadas por *S. aureus* principalmente tienen la función de convertir los tejidos locales del hospedero en nutrientes requeridos para el crecimiento de la bacteria.

La coagulasa codificada, por el gen *coa*, se presenta en dos formas: como factor de agregación o coagulasa ligada (*clumping factor*) que es capaz de convertir directamente el fibrinógeno en fibrina produciendo la coagulación del plasma, lo que facilita el desarrollo de sepsis y abscesos, esta no requiere la intervención de factores plasmáticos; por otro lado está la coagulasa libre que reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (CRF), presente en el plasma, dando lugar a un complejo análogo a la trombina que reacciona con el fibrinógeno formando el coágulo de fibrina. Existe una fuerte correlación entre la producción de coagulasa y la virulencia de la cepa. Su importancia en la patogenia radica en la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico localizando la infección y con ello se evita la fagocitosis de la bacteria (Cervantes *et al.*, 2014).

La catalasa degrada el peróxido de hidrógeno dando protección al microorganismo contra la fagocitosis, por lo que inactiva algunos sistemas de ingestión de los PMN. La estafiloquinasa degrada la fibrina y contribuye a la invasión de tejidos vecinos. La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico de la matriz intracelular de mucopolisacáridos de los tejidos y por tanto contribuye a la diseminación a tejidos adyacentes. La lipasa ayuda al microorganismo a diseminarse por los tejidos cutáneos y subcutáneos, las cepas que producen esta enzima causan forunculosis crónica. La fosfolipasa C está asociada con cepas recuperadas de pacientes con distres respiratorio del adulto y coagulación intravascular diseminada (eventos que ocurren durante la sepsis). Aparentemente los tejidos afectados por

esta enzima se vuelven más susceptibles al daño y destrucción por componentes bioactivos del complemento y sus productos durante su activación. Además la mayoría de las cepas de *S. aureus* sintetizan otras enzimas como nucleasas que colaboran en el proceso infeccioso y en la producción de lesiones (Cervantes *et al.*, 2014).

Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que actúan en zonas distantes del foco infeccioso. Las hemolisinas tienen capacidad hemolítica y citolítica. Actúan sobre determinadas células del huesped, como leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos, forman poros  $\beta$ -barril en las membranas citoplásmicas, provocando la liberación del contenido de la célula y su muerte. *S. aureus* secreta diversas toxinas formadoras de poros, entre las que se encuentran:

- $\alpha$ -hemolisina está codificada por el gen *hla* y es la más estudiada; una vez liberada al medio se asocia con su célula blanco, es particularmente citotóxica para una gran variedad de células eucariotas como monocitos, eritrocitos, linfocitos, plaquetas y células endoteliales, en particular células del sistema inmune y es considerada por ello como un importante factor de virulencia (Castañón, 2012). Al parecer, interviene en el desarrollo de edema pulmonar y daño tisular como consecuencia del cambio de permeabilidad inducido en las células endoteliales con los consiguientes cambios en el balance iónico. Esta toxina es dermonecrótica y neurotóxica (Schmitt *et al.*, 1999).
- $\beta$ -hemolisina tiene actividad de fosfolipasa C, es específica para la esfingomiélin y la lisofosfatidilcolina, su función no se conoce muy bien; sin embargo, se cree que le da selectividad a la bacteria.
- $\gamma$ -hemolisina afecta neutrófilos, macrófagos y eritrocitos. Se cree que tiene efecto en la inducción de la inflamación.
- $\delta$ -hemolisina afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos, lisar eritrocitos y membranas celulares de esferoplastos y protoplastos, es dermonecrótica. No se sabe si induce la liberación de mediadores de la inflamación; sin embargo, el 97% de las cepas de *S. aureus* produce esta hemolisina. Se ha propuesto que esta hemolisina actúa como detergente disgregando las membranas celulares porque tiene actividad dermonecrótica y

puede ser letal en animales de laboratorio a concentraciones elevadas (Dinges *et al.*, 2000).

- La leucocidina de Panton-Valentine (PVL) se clasifica como una citolisina de dos componentes, las proteínas LukF-PV y LukS-PV que se liberan como monómeros y se insertan en la membrana plasmática del hospedero, lo que conduce a la formación de un poro. La presencia de este poro tiene como consecuencia la liberación de iones y finalmente la muerte de la célula. PVL tiene una alta actividad contra leucocitos y se encuentra comúnmente asociada con *S. aureus* resistentes a meticilina adquiridos de la comunidad (CA-MRSA), es responsable de neumonía necrosante e infecciones de la piel. Esta leucocidina está codificada por un fago (φSLT) que puede transferir la toxina PVL a otras cepas. Además está presente en un 5% de los aislamientos clínicos de *S. aureus*. Las cepas de *S. aureus* que producen PVL se asocian con forunculitis, neumonía hemorrágica severa o ambas en adultos jóvenes y niños, así como con infecciones de la piel relacionada con cepas CA-MRSA (Cervantes *et al.*, 2014).

Otros tipos, son las toxinas exfoliativas o epidermolíticas (ET) se han identificado en los serotipos A y B, están codificadas por los genes *eta* y *etb*. Ambas pueden producir el síndrome de la piel escaldada. La toxina exfoliativa A es termoestable, está codificada por un fago, mientras que la toxina B es termolábil y está codificada por plásmidos. Ambas actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin producir citólisis o inflamación; tienen actividad de serín proteasa, lo que desencadena la exfoliación (Cervantes *et al.*, 2014).

La toxina del síndrome del choque tóxico (TSST-1 por sus siglas en inglés) o también denominada enterotoxina F y las enterotoxinas estafilocócicas (SE) son el paradigma de una gran familia de exotoxinas pépticas llamadas superantígenos. Los superantígenos son proteínas cuya función primaria se enfoca en debilitar el sistema inmune del hospedero a través de su habilidad para estimular lo suficiente la proliferación de linfocitos T sin tener en cuenta la especificidad del antígeno de estas células, para que el patógeno pueda propagarse y conducir a la progresión de la enfermedad. Además no activan el sistema inmune a través de un contacto normal entre las células presentadoras del antígeno y los linfocitos.

La toxina TSST-1, codificada por el gen *tst*, se considera una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos. Actúa como superantígeno e induce la liberación de citocinas por macrófagos y linfocitos T. A bajas concentraciones produce la extravasación de las células endoteliales, y a altas concentraciones tiene un efecto citotóxico (Dinges *et al.*, 2000).

Los síntomas típicos de la síndrome del shock tóxico son fiebre alta, dolor de cabeza, vómito, diarrea, mialgias y supuración eritematosa. Otros síntomas incluyen meningitis, faringitis, conjuntivitis, vaginitis, edema, artralgia, irritabilidad, fatiga y dolor abdominal. En adultos puede producir síndrome de dificultad respiratoria, coagulación intravascular y falla renal. El síndrome del shock tóxico puede ser menstrual (por coincidir con el periodo menstrual), y está asociado con el uso de tampones, o bien puede ser no menstrual en cuyo caso se pueden producir abscesos, bursitis, infecciones postparto, procedimientos postquirúrgicos e infecciones vaginales (Bustos *et al.*, 2006).

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales problemas para la salud pública. *S. aureus* es el agente etiológico más frecuente entre las intoxicaciones de origen alimentario. Su presencia en alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, por inadecuadas prácticas de manufactura o por la utilización de materia prima contaminada (Manfredi *et al.*, 2010).

Se han descrito diferentes enterotoxinas estafilocócicas (SEA-SEE y SEG-J), que son producidas por el 30 a 50% de las cepas de *S. aureus*, son codificadas por los genes *sea-see* y *seg-sej*; siendo la toxina A la más frecuente. Son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas del hospedero, además de ser responsables de intoxicaciones y cuadros de enterocolitis. Poseen características inmunomoduladoras propias de los superantígenos que estimulan la proliferación de células T no específicas; las SE's comparten relaciones filogenéticas cercanas, teniendo similares estructuras y actividades (Balaban & Rasooly, 2000; Bustos *et al.*, 2006).

Los síntomas que presenta una persona que ha sido afectada por una intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE) son muy particulares, lo que que la diferencia de otras infecciones alimentarias. Tales manifestaciones clínicas incluyen náuseas, dolor abdominal,

emesis, diarrea y pos tración; en los casos más graves se puede presentar cefalea. Cabe destacar que la intensidad de los síntomas depende de la cantidad de alimento contaminado ingerido, de la concentración de la toxina y de la susceptibilidad individual, la cual es tá mediada por la edad y por el estado inmunológico de la persona (Zendejas *et al.*, 2014).

Además algunas cepas de *S. aureus* también poseen otros factores de virulencia; la vía de arginina deiminasa codificada por el gen *arcA*, con esta vía la bacteria convierte la L-arginina a CO<sub>2</sub>, ATP y amonio, lo cual es de gran importancia para sobrevivir a un pH bajo e inhibir la respuesta inmune contra infecciones bacterianas (Moncada & Higgs, 1993; Degnan *et al.*, 2000; Pi *et al.*, 2009). La serin proteasa V8 codificada por el gen *v8*, separa uniones de fibronectina y por lo tanto desempeña un papel importante en la regulación post traduccional de la actividad de exoproteínas de *S. aureus*, además de modificar las proteínas del hospedero en beneficio de la bacteria (McGavin *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 2001; Calander *et al.*, 2007). Por último la proteína inhibidora de la quimiotaxis codificada por el gen *chp* actúa como un inhibidor potente y específico de la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos hacia anafilotoxina C5a (Agarwal, 1967; De Hass *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 2004).

Dentro de las enfermedades asociadas a *S. aureus* están la intoxicación alimentaria (siendo los alimentos más frecuentemente contaminados el huevo, la leche, la carne de pollo, el jamón, el chorizo), la foliculitis, forúnculos, infección de herida, bacteremia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, síndrome de shock tóxico, síndrome de la piel es caldada, septicemia, endocarditis, neumonía, meningitis, empiema y periodontitis. (Murray *et al.*, 2009; Zendejas *et al.*, 2014).

### 1.3 Enfermedad periodontal

En la cavidad oral *S. aureus* se encuentra asociado con lesiones dentoalveolares agudas, quistes en la mandíbula infectada, abscesos endodónticos, parodontitis supurativa aguda, lesiones en la mucosa oral y estomatitis inducida por prótesis (Rams *et al.*, 1990).

Un gran número de infecciones en el humano son causadas por biopelículas incluyendo la caries dental y la enfermedad periodontal. Estas enfermedades a diferencia de infecciones en donde se conoce el agente causal específico, son de transcurso crónico y persistente, lo que hace difícil su erradicación. La enfermedad periodontal es de gran incidencia en el ser humano y se caracteriza por un proceso inflamatorio que resulta en la pérdida del soporte del diente. Todo comienza con la formación de una película de origen glandular (saliva, moco) que recubre las mucosas, las superficies dentales y epiteliales de la encía; luego llegan los primeros colonizadores que ofrecen medios para la retención de otros microorganismos dando origen a una comunidad celular diversa. Con el crecimiento de la biopelícula aumenta la liberación de productos microbianos, como el lipopolisacárido, factor de virulencia responsable de desencadenar una respuesta inflamatoria e inmune de tipo local que puede llegar a ser sistémica, ocasionando procesos inflamatorios en lugares diferentes (Betancourth *et al.*, 2004).

La periodontitis es una enfermedad con un ocurrencia entre 5 y 20 % (en incremento) en poblaciones de países desarrollados (Smith *et al.*, 2001). A pesar de que las enfermedades periodontales son infecciones localizadas en la cavidad bucal, la inter-relación entre periodontitis y enfermedades sistémicas podría explicarse por la invasión del tejido periodontal por bacterias y otros microorganismos, que tendrían acceso directo a la circulación sanguínea, originándose de este modo una bacteriemia (Rivieri *et al.*, 1991).



## 1.4 Mecanismo de resistencia a la meticilina de *S. aureus*

*S. aureus* es un patógeno que ha adquirido mecanismos de resistencia a través de la transferencia genética horizontal (transformación y transducción), para evadir la acción de los antibióticos administrados para erradicar las infecciones. El cuadro 2 muestra la función de algunos de los antibióticos y los mecanismos de resistencia a ellos, responsables de que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (Zendejas *et al.*, 2014).

En la actualidad existen cepas de *S. aureus* conocidas como MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). El gen responsable de la resistencia a la meticilina es *mecA* que codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP), llamada PBP2a, la cual presenta baja afinidad por la meticilina y por todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que se han desarrollado (por ejemplo, la oxacilina). La proteína PBP2a continúa sintetizando peptidoglicano para la pared celular aun cuando las PBP normales estén inhibidas por los antibióticos (Hiramatsu *et al.*, 2001).

El gen *mecA* se encuentra localizado en un elemento genético móvil grande, conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* ("staphylococcal cassette chromosome *mec*", SCC*mec*), dicho gen no es endógeno de esta bacteria y se inserta en un sitio específico del cromosoma bacteriano, cerca del origen de replicación. Esta característica es de gran relevancia por que le permite replicarse en forma temprana y transcribir los genes de resistencia importados (Jiménez & Correa, 2009). Además del gen *mecA*, SCC*mec* contiene genes reguladores y secuencias de inserción que flanquean a *mecA*. Adicional a ello, contiene el complejo genético denominado *ccr* que codifica para las recombinasas *ccrA*, *ccrB* y *ccrC*, que permiten la movilidad del SCC*mec* entre las cepas estafilocócicas (Zendejas *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Mecanismos de resistencia a distintos antibióticos en cepas de *S. aureus*.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia
<b><math>\beta</math>-lactámicos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Penicilinas</li> <li>– Cefalosporinas</li> <li>– Carbapanemes</li> <li>– Monobactámicos</li> <li>– Sulbactam y ácido clavulánico</li> </ul>	Inhibición de la síntesis de la pared celular	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Producción de <math>\beta</math>-lactamasas</li> <li>2. Mutación de PBPs</li> <li>3. Baja penetración</li> </ol>
<b>Polimixinas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Polimixina B</li> <li>– Colistina</li> </ul>	Alteración de la membrana celular	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Baja penetración</li> </ol>
<b>Aminoglucósidos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Estreptomicina</li> <li>– Gentamicina</li> <li>– Neomicinaa</li> <li>– Kanamicina</li> </ul>	Inhibición de la síntesis de proteínas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mutación del sitio de unión en el ribosoma</li> <li>2. Baja penetración</li> <li>3. Modificación enzimática (acetilación, fosforilación)</li> </ol>
<b>Tetraciclinas</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Destoxificación enzimática</li> <li>2. Baja penetración</li> </ol>
<b>Cloranfenicol</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Modificación enzimática (Cloranfenicol acetil transferasa)</li> </ol>
<b>Macrólidos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Eritromicina</li> <li>– Lincomicina</li> <li>– Clindamicina</li> </ul>	Inhibición de la síntesis de proteínas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mutación del sitio de unión en el ribosoma</li> </ol>
<b>Quinolonas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Ácido nalidíxico</li> <li>– Pefloxacina</li> <li>– Norfloxacin</li> </ul>	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mutación de la subunidad alfa de la DNA girasa</li> <li>2. Disminución de la captación</li> </ol>
<b>Rifampicina</b>	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mutación de la RNA polimerasa</li> </ol>
<b>Sulfonamidas y Trimetoprim</b>	Inhibición de la síntesis de ácido fólico	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Síntesis por vía alterna no sensible al fármaco</li> </ol>

## 2. ANTECEDENTES

- Nashev y colaboradores (2004) identificaron en 44 cepas de *S. aureus* aisladas de narinas anteriores de pacientes infectados y de portadores nasales sanos los genes *sea-sej* y *tsst-1* que codifican para algunas toxinas.
- Souto y colaboradores (2006) determinaron la prevalencia de bacterias patógenas “no orales” en biofilm subgingival de pacientes con periodontitis crónica y personas sanas. Predominaron 5 especies de bacterias patógenas “no orales” entre ellas *S. aureus*.
- Campbell *et al.*, (2008) estudiaron 90 cepas de *S. aureus* de origen clínico aisladas de tratamientos de complicaciones en la piel e infecciones estructuradas en piel. Los genes que codifican para toxinas detectados con mayor frecuencia en las cepas fueron *sea*, *sed*, *see*, *seg*, *sej*, *pvl*, *tst*, *eta* y *etb*.
- Paniagua *et al.*, (2014) emplearon un modelo de infección *in vitro* de epitelio reconstituido humano para establecer en 21 cepas de MRSA, aisladas de pacientes con hemodiálisis, la expresión de 16 genes que codifican para toxinas. Los genes frecuentemente expresados en las cepas durante la infección fueron: *seg*, *seh*, *sei*, *eta*, *etb*, y *hla*.
- Kim y Lee (2015) realizaron un estudio en cepas bacterianas de *S. aureus* aisladas de muestras de saliva de 112 pacientes diagnosticados con periodontitis; determinaron la susceptibilidad a los antibióticos y detectaron genes de toxinas en ellas. La mayoría de las cepas fueron resistentes a ampicilina y los genes que codifican para toxinas con mayor frecuencia fueron: *sea*, *seb*, *sei*, *seq* y *hla*, *hlb* y *hld*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los sitios anatómicos más estudiados en infecciones ocasionadas por *S. aureus* son la mucosa nasal y la piel. Debido a que existen pocos trabajos sobre las infecciones periodontales por *S. aureus* (Smith *et al.*, 2001), el presente estudio contribuirá a determinar la frecuencia de los genes de virulencia y la susceptibilidad a los antibióticos en un grupo de cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con periodontitis.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

- ✚ Establecer la frecuencia de los genes que codifican para toxinas y otros marcadores de virulencia en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con periodontitis.

### 4.2 Particulares

- ✚ Establecer la frecuencia de *S. aureus* en las infecciones periodontales.
- ✚ Determinar la susceptibilidad a los antibióticos en las cepas de *S. aureus* por el método de Kirby-Bauer.
- ✚ Identificar el gen que codifica la resistencia a la meticilina *mecA* en las cepas de *S. aureus*.
- ✚ Establecer la frecuencia de los genes de enterotoxinas (*sea-see* y *seg-sei*), de toxinas exfoliativas (*eta* y *etb*), del síndrome del choque tóxico (*tst*), de adhesión (*ica*), y de otros factores de virulencia como son: proteína de la quimiotaxis (*chp*), vía de arginina deiminasa (*arcA*) y serina proteasa V8 (*v8*) en las cepas de *S. aureus*.
- ✚ Identificar los diferentes patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas de *S. aureus*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Toma de muestras

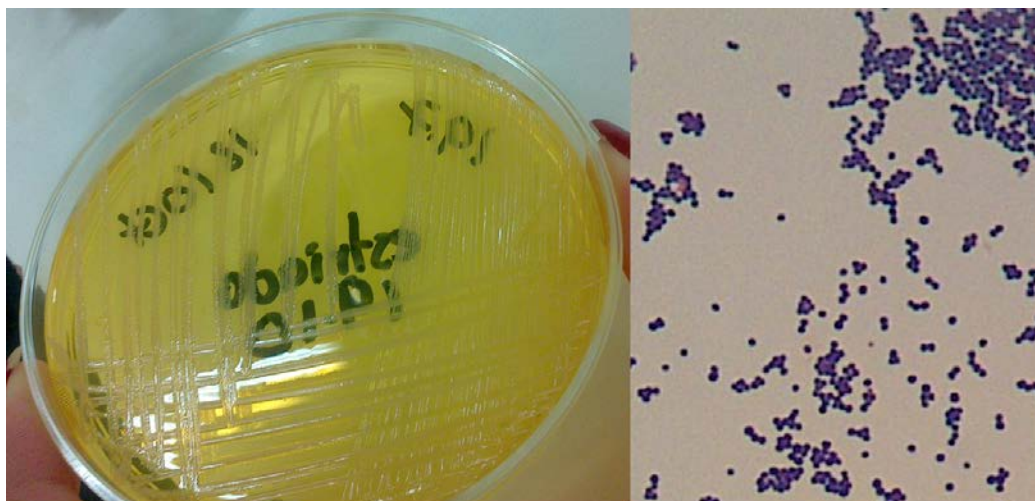
Para el desarrollo de este estudio se seleccionó un grupo de pacientes de la Clínica de Endoperiodontología con signos y síntomas de infección periodontal (inflamación, enrojecimiento, supuración y dolor). Por medio de hisopos estériles se tomó una muestra de la zona infectada (Fotografía 1) y se depositó en el medio líquido de cultivo BHI (brain heart infusion), las muestras se trasladaron al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala para incubarlas a 37°C por 24 horas.



**Fotografía 1.** Toma de muestra a pacientes diagnosticados con infección periodontal.

## 5.2 Identificación de *S. aureus* por pruebas bioquímicas

Las muestras previamente incubadas en BHI se sembraron por el método de estría cruzada en los medios sólidos de Agar sangre, S-110 (*Staphylococcus* Agar No. 110), Sabouraud y EMB (Eosina azul de metileno) y se incubaron a 37°C por 24 horas. La identificación de *S. aureus* se realizó por morfología colonial y microscópica (tinción de Gram) (Fotografía 2), y por las pruebas bioquímicas de la fermentación de manitol y la técnica de la coagulasa en placa (Fotografía 3).



**Fotografía 2.** Crecimiento colonial en agar S-110 y observación al microscopio óptico (100x).



**Fotografía 3.** Pruebas de la coagulasa en placa y fermentación en manitol.

## 5.3 Pruebas moleculares

### 5.3.1 Extracción de DNA

El DNA fue extraído por el método de ebullición, de la siguiente manera: se tomó una asada de cada cepa y se colocó en tubos con tapón de rosca (16 x 150 mm) estériles con 2 mL de agua desionizada estéril. Se suspendieron las bacterias por agitación en Vortex y los tubos se colocaron en baño María (100°C) durante 20 min, posteriormente se incubaron en hielo (0°C) por 20 minutos.

Con la ayuda de micropipetas y puntas estériles nuevas se tomó 1.7 mL de cada muestra y se depositó en un tubo eppendorf nuevo y estéril. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 minutos (Fotografía 4). El sobrenadante, que contenía el DNA bacteriano se separó con una micropipeta de 1000 µL y se depositó en otro tubo eppendorf nuevo y estéril, el cual se etiquetó y almacenó a -20°C para su utilización en la PCR (Paniagua *et al.*, 2015).



Fotografía 4. Método para la extracción de DNA por ebullición.

### 5.3.2 Identificación de *S. aureus* por PCR

La identificación de *S. aureus* se realizó por PCR convencional amplificando los marcadores cromosómicos *spa* (región X), 23S rRNA, *coa* y *nuc*. Los primers y las condiciones de la PCR fueron los descritos por Nashev y colaboradores en 2004 (Cuadro 3) (Fotografía 5 y 6). Para lo cual se utilizó el equipo comercial Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs). El



volumen final de cada mezcla de reacción fue de 20  $\mu$ L; 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) (Cuadro 1), 10  $\mu$ L de Kapa Taq, 3  $\mu$ L de ADN molde, y 5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La cepa control positiva fue *S. aureus* ATCC 33592 *mecA*+ y la cepa control negativa *S. epidermidis* ATCC 12228 *ica*-.



Fotografía 5. Preparación de la mezcla de reacción para PCR.



Fotografía 6. Termocicladores empleados para PCR convencional y multiplex.

Las condiciones para la amplificación de cada gen fueron:

Gen *spa* (región X): desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente una extensión a 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4°C por 2 minutos.

Gen 23S rRNA: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 37 ciclos (desnaturalización 94°C por 40 segundos, alineación a 64°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1.15 minutos). Con una extensión final de 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4°C por 2 minutos.

Gen *coa*: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 58°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente una extensión a 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4°C por 2 minutos.

Gen *nuc*: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 37 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos). Finalmente una extensión final a 72°C por 3 minutos y un enfriamiento a 4°C por 2 minutos.

**Cuadro 3.** Oligonucleótidos utilizados para la identificación de *S. aureus*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<b>23S rRNA</b>	Forward	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC	1250
	Reverse	AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	
<b><i>spa</i> (región X)</b>	Forward	CAA GCA CCA AAA GAG GAA	Tamaño polimórfico
	Reverse	CAC CAG GTT TAA CGA CAT	
<b><i>nuc</i></b>	Forward	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	Tamaño polimórfico
	Reverse	ACG CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	
<b><i>coa</i></b>	Forward	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G	279
	Reverse	GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	

### 5.3.3 Identificación de genes de toxinas de *S. aureus* por PCR

La detección de los genes de toxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *eta*, *etb* y *tst* se realizó por medio de PCR convencional, por otro lado los genes de toxinas *seg* y *sei* se amplificaron por PCR multiplex; conforme a lo descrito por Campbell y colaboradores en el 2008 (Cuadro 4). Como controles positivos se utilizaron cepas de *S. aureus* portadoras de los distintos genes de toxinas facilitadas por el cepario del Laboratorio Clínico y como control

negativo la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 *ica-*. Para lo cual se utilizó el equipo comercial Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs). El volumen final de la mezcla de reacción de PCR convencional fue de 20 µL; 1 µL de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) (Cuadro 4), 10 µL de Kapa Taq, 3 µL de ADN molde, y 5 µL de agua libre de nucleasas. Para la PCR multiplex el volumen final fue de 20 µL; 1 µL de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) (Cuadro 4), 10 µL de Kapa Taq, 3 µL de ADN molde y 3 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones para la amplificación de PCR convencional y multiplex fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, 32 ciclos (desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1.3 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto). Por último una extensión a 72°C por 10 minutos y un enfriamiento a 4°C.

**Cuadro 4.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de toxinas de *S. aureus*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>sea</i>	Forward	TTG CAG GGA ACA GCT TTA GGC AAT C	252
	Reverse	TGG TGT ACC ACC CGC ACA TTG A	
<i>seb</i>	Forward	GAC ATG ATG CCT GCA CCA GGA GA	355
	Reverse	AAC AAA TCG TTA AAA ACG GCG ACA CAG	
<i>sec</i>	Forward	CCC TAC GCC AGA TGA GTT GCA CA	602
	Reverse	CGC CTG GTG CAG GCA TCA TAT C	
<i>sed</i>	Forward	GAA AGT GAG CAA GTT GGA TAG ATT GCG GCT AG	830
	Reverse	CCG CGC TGT ATT TTT CCT CCG AGA G	
<i>see</i>	Forward	TGC CCT AAC GTT GAC AAC AAG TCC A	532
	Reverse	TCC GTG TAA ATA ATG CCT TGC CTG AA	
<i>seg</i>	Forward	TGC TCA ACC CGA TCC TAA ATT AGA CGA	117
	Reverse	CCT CTT CCT TCA ACA GGT GGA GAC G	
<i>seh</i>	Forward	CAT TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG AAG	358
	Reverse	GCA CCA ATC ACC CTT TCC TGT GC	
<i>sei</i>	Forward	TGG AGG GGC CAC TTT ATC AGG A	220
	Reverse	TCC ATA TTC TTT GCC TTT ACC AGT G	
<i>sej</i>	Forward	CTC CCT GAC GTT AAC ACT ACT AAT AAC CC	432
	Reverse	TAT GGT GGA GTA ACA CTG CAT CAA AA	
<i>eta</i>	Forward	CGC TGC GGA CAT TCC TAC ATG G	676
	Reverse	TAC ATG CCC GCC ACT TGC TTG T	
<i>etb</i>	Forward	GAA GCA GCC AAA AAC CCA TCG AA	419
	Reverse	TGT TGT CCG CCT TTA CCA CTG TGA A	
<i>tst</i>	Forward	AGC CCT GCT TTT ACA AAA GGG GAA AA	306
	Reverse	CCA ATA ACC ACC CGT TTT ATC GCT TG	

### 5.3.4 Identificación de otros factores de virulencia de *S. aureus* por PCR

Para la detección de los genes de los otros factores de virulencia, *chp*, *v8* y *arcA*, se realizó PCR convencional conforme a lo descrito por Campbell y colaboradores en el 2008 (Cuadro 5). Se utilizó el equipo comercial Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs). El volumen final para cada mezcla de reacción fue de 20 µL; 1 µL de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) (Cuadro 5), 10 µL de Kapa Taq, 3 µL de ADN molde, y 5 µL de agua libre de nucleasas.

Las condiciones para la amplificación de los genes *chp* y *v8* fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, 32 ciclos (desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1.3 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos y un enfriamiento a 4°C. Mientras que las condiciones para el gen *arcA* fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos (desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos y un enfriamiento a 4°C. Como controles positivos se utilizaron cepas de *S. aureus* portadoras de los distintos genes de toxinas facilitadas por el cepario del Laboratorio Clínico y como control negativo la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 *ica*-.

**Cuadro 5.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de otros genes que codifican factores de virulencia en *S. aureus*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>chp</i>	Forward	AAC GGC AGG AAT CAG TAC ACA CCA TC	479
	Reverse	GGC AAG TTA TGA AAT GTC TGC CAA ACC	
<i>v8</i>	Forward	CAA CGA ATG GTC ATT ATG CAC CCG TA	529
	Reverse	TTT GGT ACA CCG CCC CAA TGA A	
<i>arcA</i>	Forward	CAC GTA ACT TGC TAG AAC GAG	724
	Reverse	GAG CCA GAA GTA CGC GAG	

### 5.3.5 Identificación del gen de adhesina *icaA* de *S. aureus* por PCR

La detección del gen de adhesina *icaA* se realizó conforme a lo descrito por Campbell y colaboradores en el 2008 (Cuadro 6). Para lo cual se utilizó el equipo comercial Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 20 μL; 1 μL de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) (Cuadro 6), 10 μL de Kapa Taq, 3 μL de ADN molde, y 5 μL de agua libre de nucleasas. Las condiciones para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, 32 ciclos (desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 1.3 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos y un enfriamiento a 4°C. El control positivo fue la cepa *S. aureus* ATCC 33592 *mecA*<sup>+</sup> y el control negativo *S. epidermidis* ATCC 12228 *ica*<sup>-</sup>.

**Cuadro 6.** Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *icaA* en cepas de *S. aureus*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>icaA</i>	Forward	TCA GAC ACT TGC TGG CGC AGT C	936
	Reverse	TCA CGA TTC TCT CCC TCT CTG CCA TT	

### 5.3.6 Detección del gen *mecA* en *S. aureus*

La detección del gen que confiere resistencia a la meticilina en *S. aureus* (*mecA*) se realizó por PCR convencional de acuerdo a lo descrito por Martín y colaboradores en el 2004 (Cuadro 7). Para lo cual se utilizó el equipo comercial Kapa Taq Ready Mix™ (Kapa Biosystems™) (1.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 20 μL; 1 μL de cada oligonucleótido (Sigma-Genosys) (Cuadro 7), 10 μL de Kapa Taq, 3 μL de ADN molde, y 5 μL de agua libre de nucleasas. Las condiciones para la amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 66°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto); posteriormente 5 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 64°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto) y 25 ciclos (desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineación a 50°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto). Finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos y un enfriamiento a 4°C. La cepa control positivo fue *S. aureus* ATCC 33592 *mecA*<sup>+</sup> y la cepa control negativo fue *S. aureus* ATCC 25923 *mecA*<sup>-</sup>.

**Cuadro 7.** Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *mecA* en cepas de *S. aureus*.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>mecA</i>	Forward	GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	310
	Reverse	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	

## 5.4 Análisis de los amplicones por electroforesis en geles de agarosa

Los amplicones obtenidos de cada reacción de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para cada 100 mL de agarosa se agregaron 0.3  $\mu$ L de solución de Midori Green (BIORAD) para la visualización del DNA. Las condiciones de corrimiento fueron: 120 volts, 94 miliamperes por un tiempo de 35 minutos. Los tamaños de los amplicones fueron comparados con un marcador de 100 pb. Los geles se observaron bajo luz UV y fueron fotografiados con el sistema de foto documentación GEL LOGIC 100 (KODAK) (Fotografía 7).

**Fotografía 7.** Análisis de amplicones en geles de agarosa y fotodocumentación.

## 5.5 Susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby Bauer

Para probar la susceptibilidad y/o resistencia a los antibióticos en cada una de las cepas de *S. aureus* se utilizó la técnica de Kirby-Bauer. Para lo cual se tomaron por medio de un hisopo estéril 5 colonias de cada cepa crecida en MH (Mueller Hinton) y se inocularon sobre la totalidad de la superficie del agar MH. Por último se tomó un sensidisco con los doce antimicrobianos (BIO-RAD) con una pinza estéril y se colocó sobre el agar MH (Fotografía 8). Así el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a 37°C. De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del diámetro del halo de inhibición (el cual se midió con un vernier), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte.



**Fotografía 8.** Sensidisco con 12 antimicrobianos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Pacientes estudiados

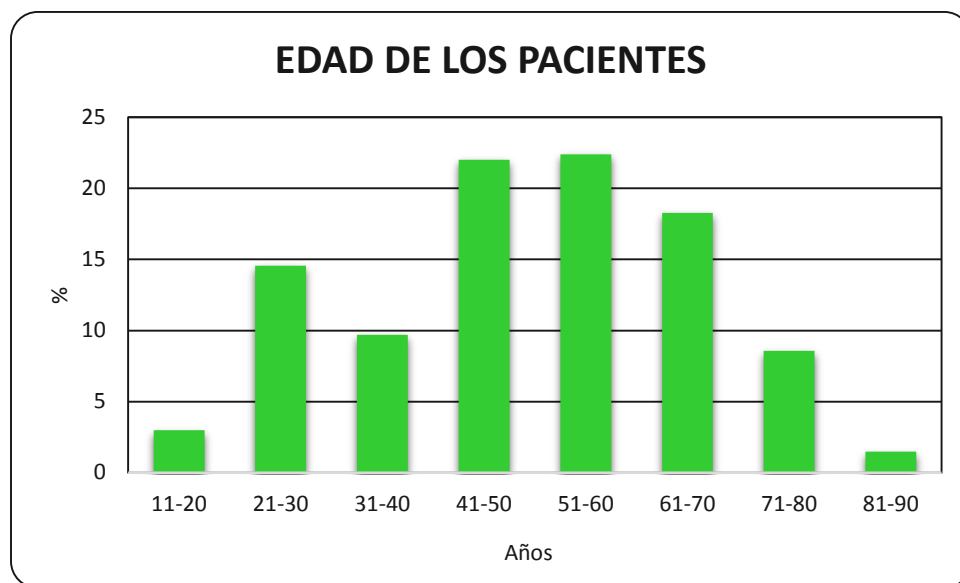
Se analizó un total de 268 pacientes con infecciones periodontales, dichos pacientes presentaban gingivitis (n=15), periodontitis crónica moderada (n= 162) y periodontitis crónica grave (n= 91). El 58 % (n=155) de los pacientes correspondió al sexo femenino, mientras que el 42% (n=113) al sexo masculino (Figura 1).



Figura 1. Distribución de los pacientes por género.



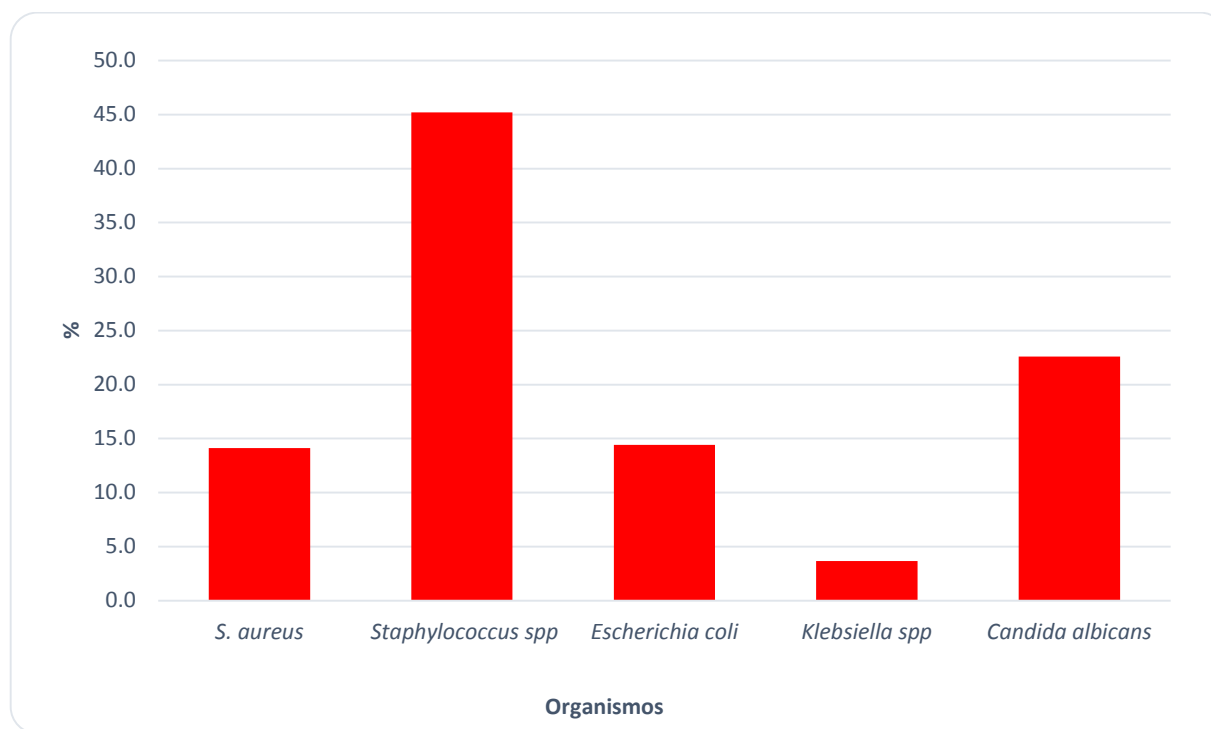
El grupo de edad con mayor frecuencia fue 51-60 con un 22.4% (n=60), seguido por 41-50 con un 22% (n=59), 61-70 con 18.3% (n=49) y 21-30 con 14.6% (n=39). Finalmente los grupos con menor frecuencia fueron: 31-40 con 9.7% (n= 26), 71-80 con 8.6% (n= 23), 11-20 con 3% (n=8) y 81-90 con 1.5% (n=4).



**Figura 2.** Distribución de los pacientes por edad.

## 6.2 Identificación bacteriana

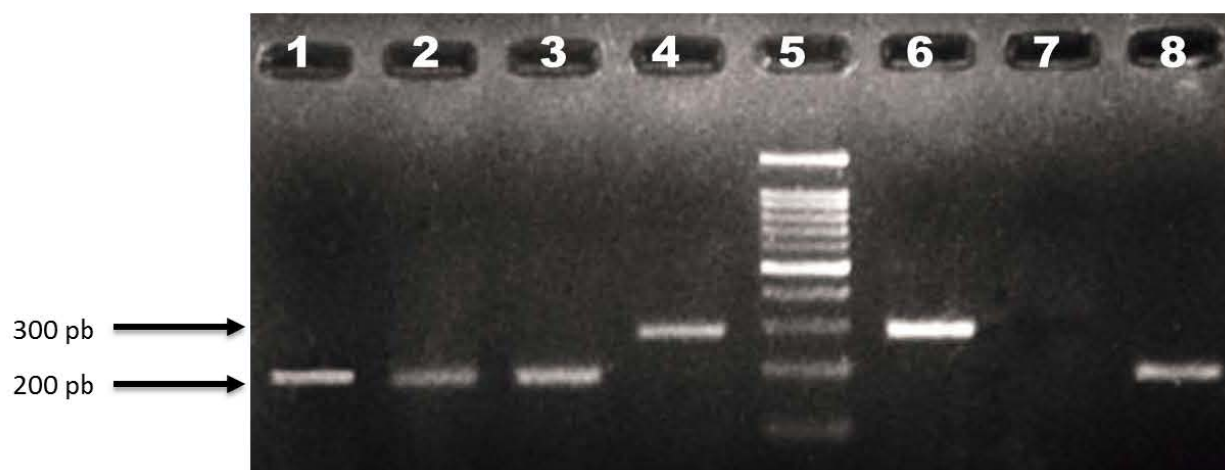
A partir de los 268 cultivos microbiológicos realizados a los pacientes con enfermedad periodontal se aislaron 354 cepas, identificando a dos géneros y tres especies. El género aislado con más frecuencia fue *Staphylococcus* spp. con 45.2% (n=160), seguido por el hongo *Candida albicans* con 22.6% (n=80), *Escherichia coli* con 14.4% (n=51), *Staphylococcus aureus* 14.1% (n=50) y *Klebsiella* spp. con 3.7% (n=13) (Figura 3).



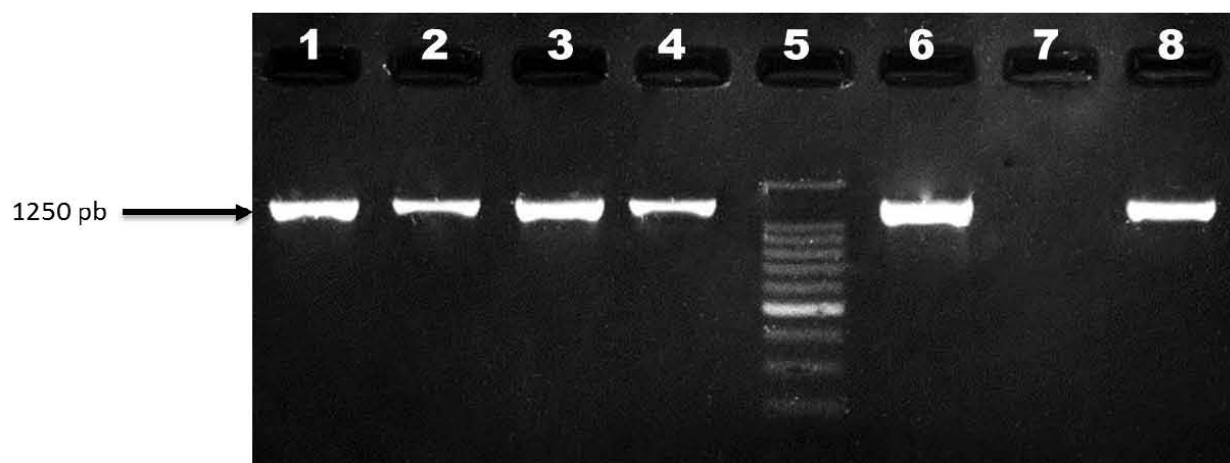
**Figura 3.** Frecuencia de los diferentes microorganismos identificados en los pacientes.

### 6.3 Identificación de *S. aureus*

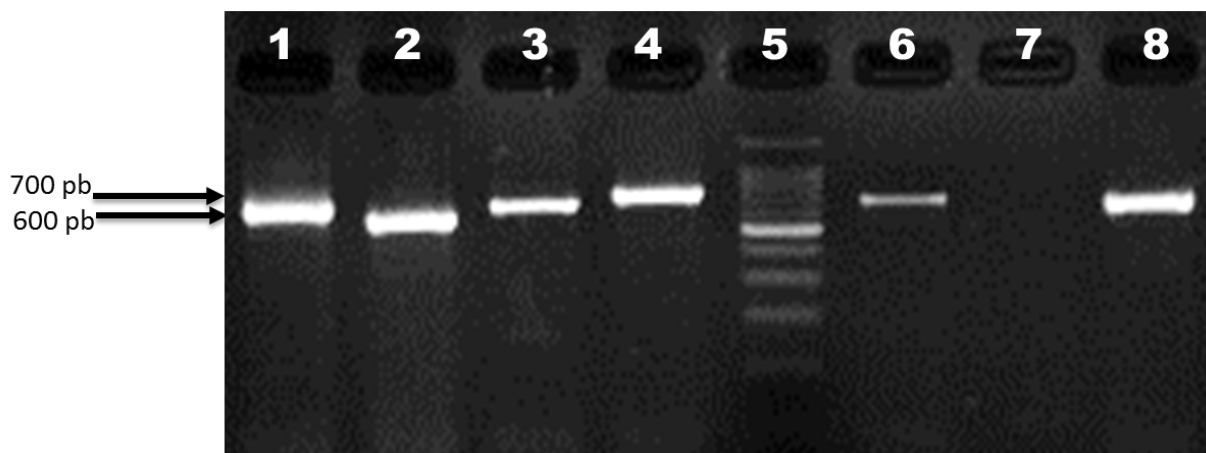
De los 268 pacientes estudiados, el 18.7% (n=50) fue portador de *S. aureus*. La identificación de *S. aureus* fue confirmada por PCR mediante amplificación de los genotipos *spa* (región X) (Fotografía 9), 23S rRNA (Fotografía 10), *coa* (Fotografía 11) y *nuc* (Fotografía 12).



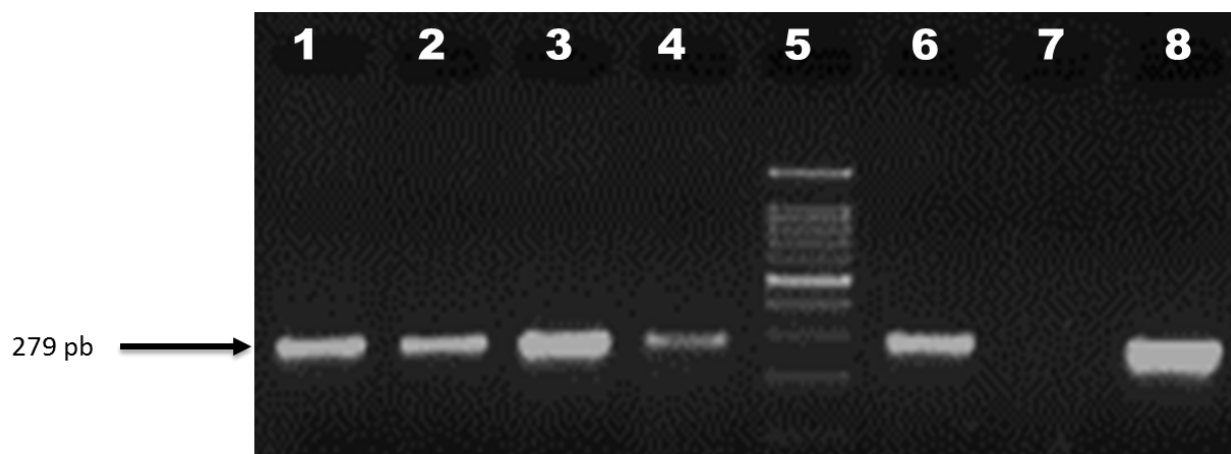
Fotografía 9. Detección por PCR convencional del gen *spa* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *spa* (amplicón de 200 y 300 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S. epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592 *mecA*+).



Fotografía 10. Detección por PCR convencional del gen 23S rRNA en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, 23S rRNA (amplicón de 1250 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S. epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592 *mecA*+).



Fotografía 11. Detección por PCR convencional del gen *coa* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *coa* (amplicón de 600 y 700 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S. epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592 *mecA*+).



Fotografía 12. Detección por PCR convencional del gen *nuc* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *nuc* (amplicón de 279 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S. epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592 *mecA*+).

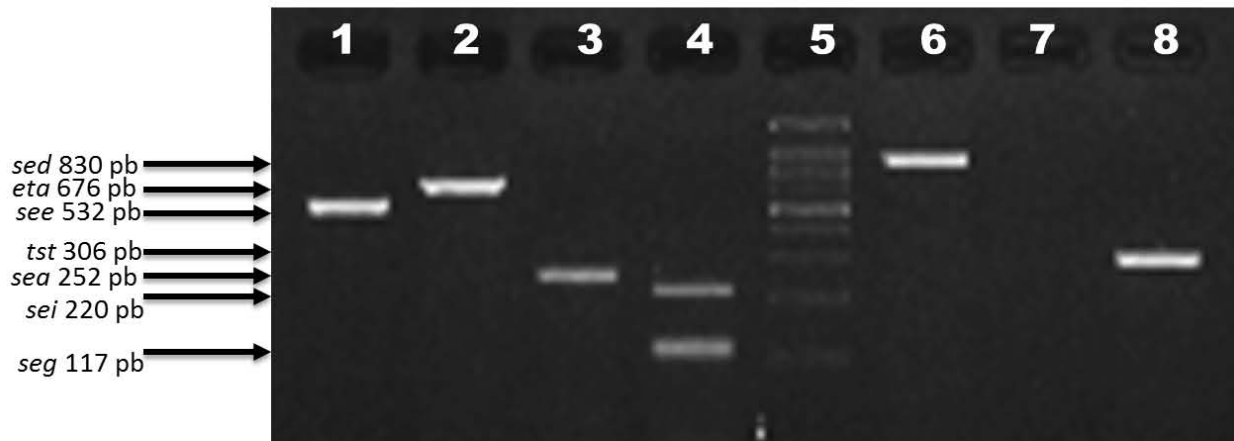
#### 6.4 Identificación de genes que codifican toxinas y otros factores de virulencia en las cepas de *S. aureus*

En el cuadro 8 se observa la frecuencia de los distintos marcadores de virulencia identificados en las cepas. Las enterotoxinas presentaron los siguientes valores: *sea* con 10% (n=5), *sed* con 4% (n=2), *see* con 28% (n=14), *seg* con 92% (n=46), *sei* con 60% (n=30), mientras que *seb*, *sec*, *seh*, *sej* no se detectaron en las cepas analizadas. La frecuencia de

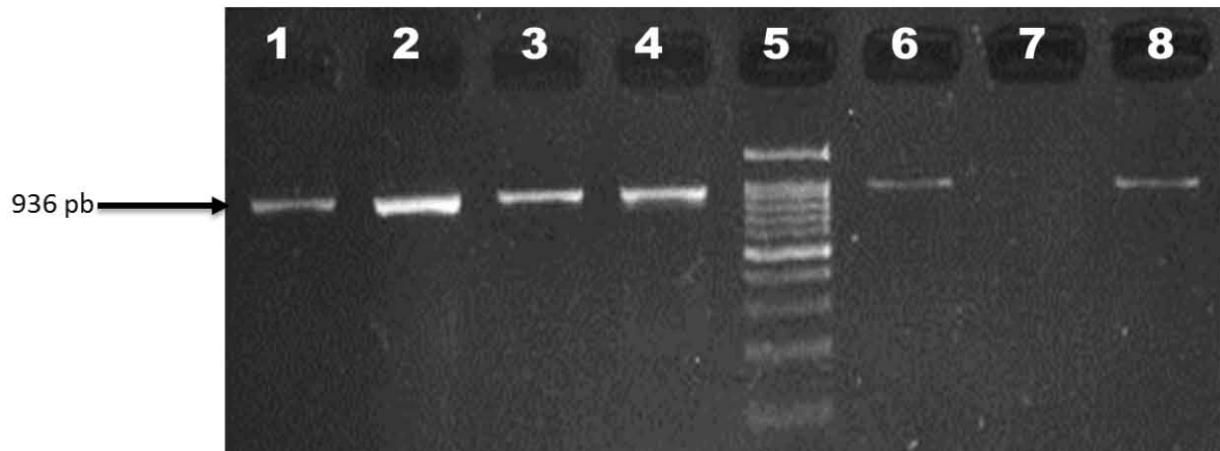
toxinas exfoliativas fue: *eta* con 20% (n=10) y *etb* no se encontró presente. La toxina del shock tóxico *tst* estuvo presente en el 4% (n=2) (Fotografía 13). El gen de adhesión *icaA* en 98% (n=49) (Fotografía 14). Finalmente otros factores de virulencia presentaron los siguientes valores: *chp* con 60% (n=30) (Fotografía 15), *v8* con 100% (n=50) (Fotografía 16) y *arcA* con 72% (n=36) (Fotografía 17).

**Cuadro 8.** Porcentaje de los genes que codifican toxinas en las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal.

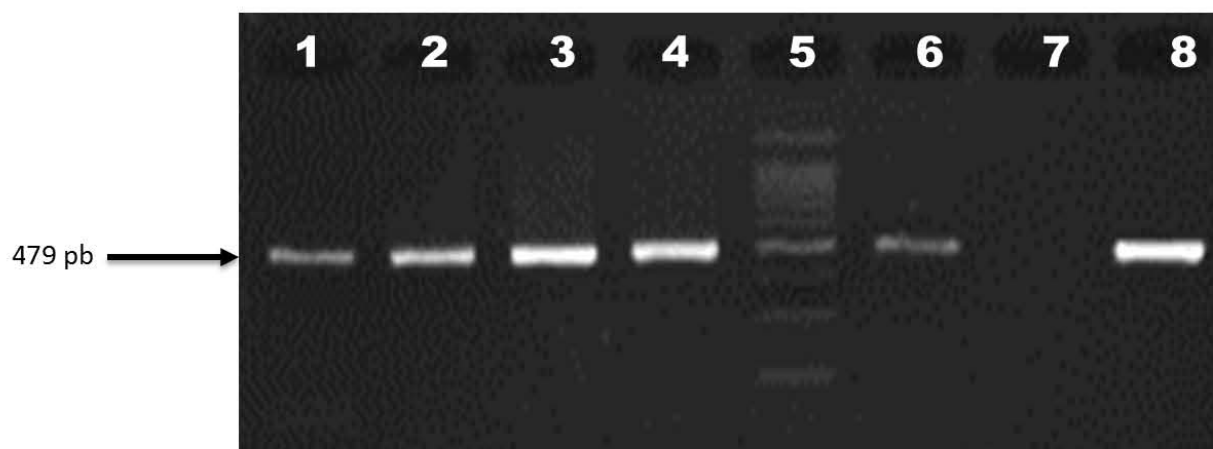
<b>Enterotoxinas</b>		
<b>Gen</b>	<b>No.</b>	<b>%</b>
<i>sea</i>	5	10
<i>seb</i>	0	0
<i>sec</i>	0	0
<i>sed</i>	2	4
<i>see</i>	14	28
<i>seg</i>	46	92
<i>seh</i>	0	0
<i>sei</i>	30	60
<i>sej</i>	0	0
<b>Toxinas exfoliativas</b>		
<i>eta</i>	10	20
<i>etb</i>	0	0
<b>Toxina del shock tóxico</b>		
<i>tst</i>	2	4
<b>Adhesión</b>		
<i>icaA</i>	49	98
<b>Otros factores de virulencia</b>		
<i>chp</i>	30	60
<i>v8</i>	50	100
<i>arcA</i>	36	72



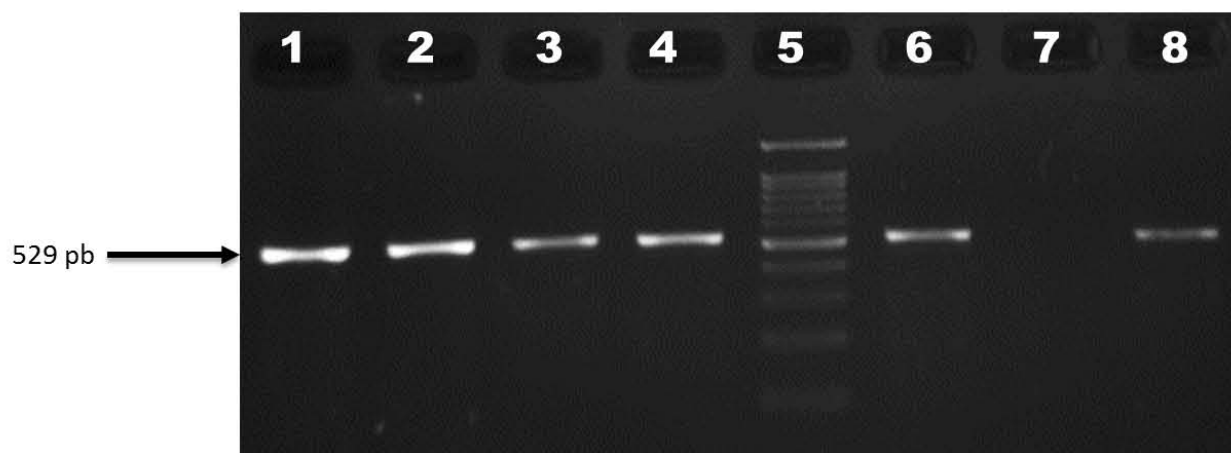
Fotografía 13. Detección por PCR de genes de toxinas en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal. Carril 1, *see* (amplicón de 532 pb); Carril 2, *eta* (amplicón de 676 pb); Carril 3, *sea* (amplicón de 252 pb); Carril 4, *sei* (amplicón de 220 pb); Carril 5, MWM (100pb); Carril 6, *sed* (amplicón de 830 pb); Carril 7, control negativo (*S.epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (cepa de *S. aureus* portadora del gen *tst* (amplicón de 306 pb).



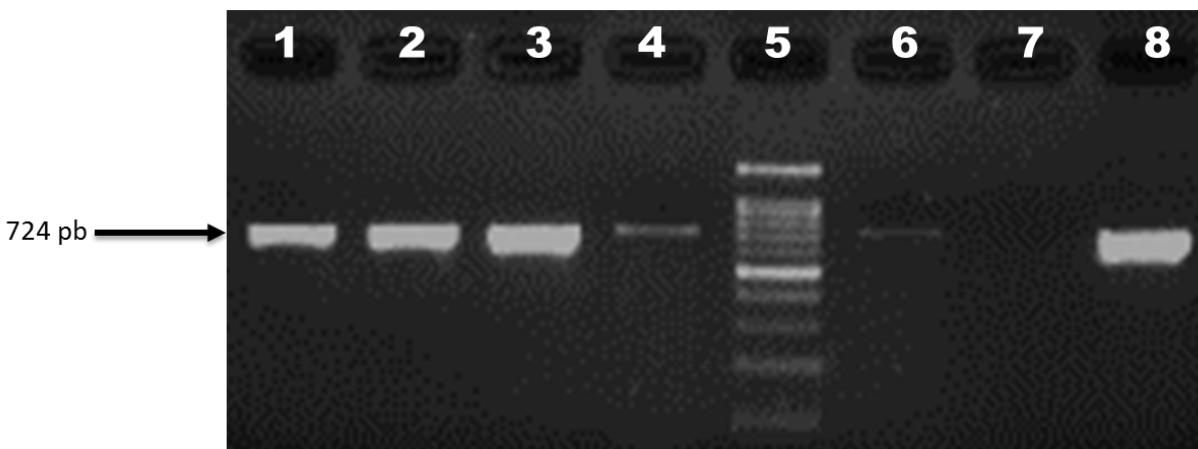
Fotografía 14. Detección por PCR convencional del gen *icaA* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *icaA* (amplicón de 936 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S.epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (cepa de *S. aureus* portadora del gen *icaA*).



Fotografía 15. Detección por PCR convencional del gen *chp* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *chp* (amplificación de 479 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S.epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (cepa de *S. aureus* portadora del gen *chp*).



Fotografía 16. Detección por PCR convencional del gen *v8* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *v8* (amplificación de 529 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S.epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (cepa de *S. aureus* portadora del gen *v8*).



Fotografía 17. Detección por PCR convencional del gen *arcA* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *arcA* (amplicón de 724 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S. epidermidis* 12228 *ica*-); Carril 8, control positivo (cepa de *S. aureus* portadora del gen *arcA*).

## 6.5 Detección del gen *mecA*

De las 50 cepas provenientes de infección periodontal e identificadas como *S. aureus*, el 100% presentó el gen de la resistencia a la meticilina *mecA* (Fotografía 18).

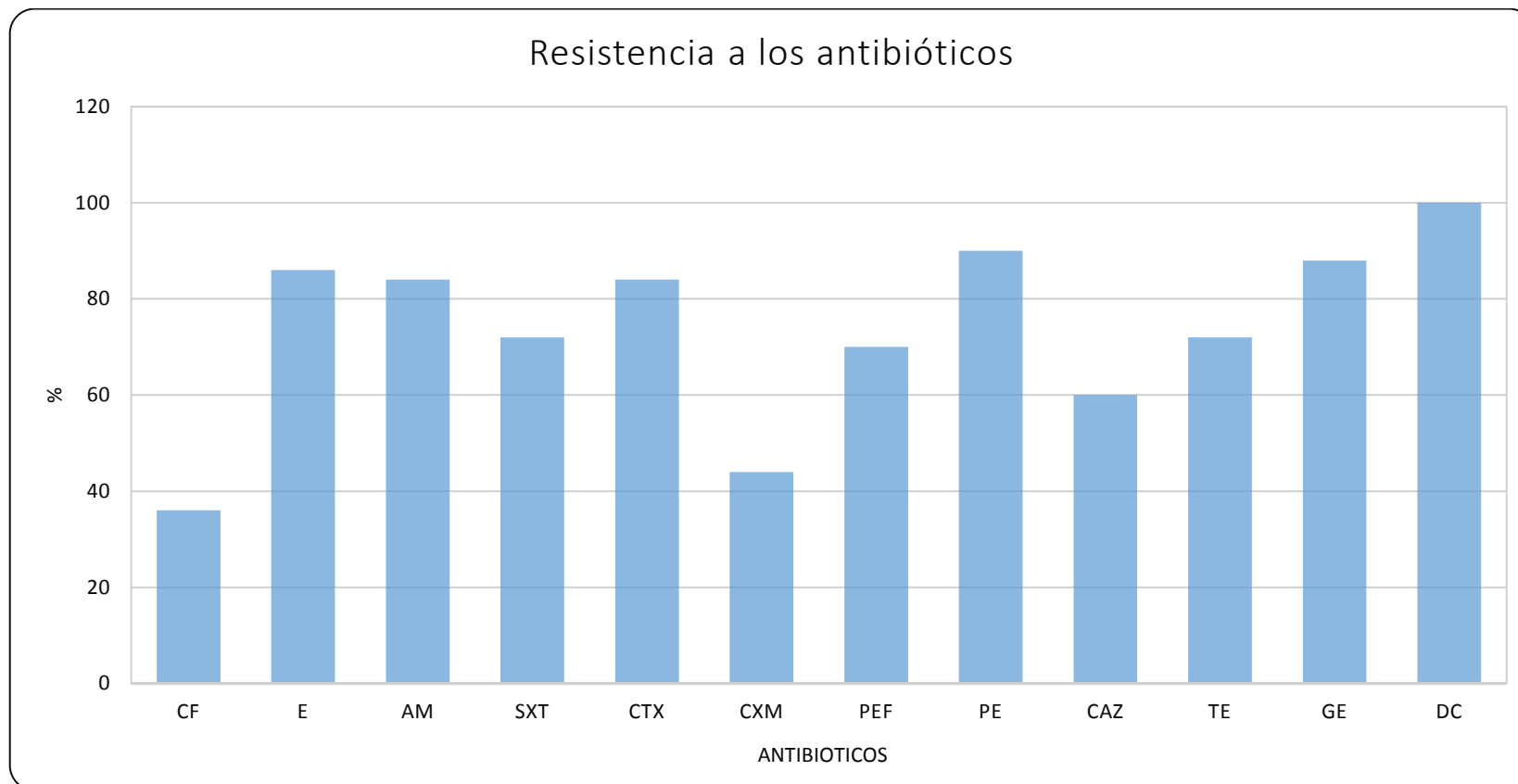


Fotografía 18. Detección por PCR convencional del gen *mecA* en *S. aureus*. Carriles 1-4 y 6, *mecA* (amplicón de 310 pb) en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal; Carril 5, MWM (100pb); Carril 7, control negativo (*S. aureus* ATCC 25923 *mecA*-); Carril 8, control positivo (*S. aureus* ATCC 33592 *mecA*+).



## 6.6 Resistencia a los antibióticos

El 100% (n=50) de las cepas de *S. aureus* mostró resistencia a la dicloxacilina, seguido de penicilina con el 90% (n=45), gentamicina con el 88% (n=44), eritromicina con el 86% (n=43), ampicilina y cefotaxima con el 84% (n= 42), en cada caso, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina con 72% (n=36) en cada caso, y pefloxacin 70% (n=35). El antibiótico al que un menor porcentaje de las cepas fue resistente fue la cefalotina con el 36% (n=18), seguido por cefuroxima 44% (n= 22) y ceftazidima 60% (n=30).



**Figura 4.** Resistencia de las cepas de *S. aureus* provenientes de infección periodontal a los distintos antibióticos. **CF**= Cefalotina, **E**= Eritromicina, **AM**= Ampicilina, **SXT**= Trimetoprim-Sulfametoxazol, **CTX**= Cefotaxima, **CXM**= Cefuroxima, **PEF**= Pefloxacina, **PE**= Penicilina, **CAZ**= Ceftazidima, **TE**= Tetraciclina, **GE**= Gentamicina, **DC**= Dicloxacilina

## 6.7 Diferentes patrones de asociación de los genes de virulencia en las cepas de *S. aureus*

En este estudio se encontraron 24 combinaciones diferentes de los genes que codifican toxinas en asociación con *mecA* en las 50 cepas de *S. aureus* (Cuadro 9). El patrón identificado con mayor frecuencia fue el No. 1 conformado por los genes *spa*, *coa*, *seg*, *sei*, *icaA*, *chp*, *v8* y *mecA* con un 16% (n=8), seguido por el patrón No. 2 (*spa*, *coa*, *seg*, *sei*, *icaA*, *chp*, *arcA*, *v8*, *mecA*) con el 12% (n=6), los patrones No. 3 (*spa*, *coa*, *seg*, *sei*, *eta*, *icaA*, *chp*, *arcA*, *v8*, *mecA*) y No. 4 (*spa*, *coa*, *see*, *seg*, *sei*, *icaA*, *arcA*, *v8*, *mecA*) fueron identificados en el 8% (n=4), en cada caso. Los patrones No. 5 y No. 6 se identificaron en el 6% (n=3). Los patrones No. 7, 8, 9 y 10 se identificaron en un 4% (n=2), en cada caso. Finalmente se encontraron 14 patrones diferentes (11-24) con una cepa en cada caso.

**Cuadro 9.** Diferentes patrones de asociación de los genes de virulencia y *mecA* en las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infección periodontal.

No. de patrón	Patrón de asociación de marcadores de virulencia y <i>mecA</i>	Periodontitis (n=50)	
		No.	%
1	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>icaA</i> , <i>chp</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	8	16%
2	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>icaA</i> , <i>chp</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	6	12%
3	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>eta</i> , <i>icaA</i> , <i>chp</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	4	8%
4	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>icaA</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	4	8%
5	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>seg</i> , <i>icaA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	3	6%
6	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>seg</i> , <i>icaA</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	3	6%
7	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>sea</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>eta</i> , <i>icaA</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	2	4%
8	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>icaA</i> , <i>chp</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	2	4%
9	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>icaA</i> , <i>chp</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	2	4%
10	<i>spa</i> , <i>coa</i> , <i>seg</i> , <i>icaA</i> , <i>chp</i> , <i>arcA</i> , <i>v8</i> , <i>mecA</i>	2	4%
11-24	Otras combinaciones	14	28%

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Pacientes estudiados

En este trabajo se analizaron 268 muestras de pacientes diagnosticados con infección periodontal, de estos, el 5.5% (n=15) presentó gingivitis, el 60.5% (n=162) padecía periodontitis crónica moderada y el 34% (n=91) presentó periodontitis crónica grave. Desde la década de los 50's, la Organización Mundial de la Salud (OMS) se interesó por primera vez en la evaluación de la enfermedad periodontal ya que en ese tiempo la caries no era un problema de salud importante, en ese momento lo frecuente era clasificar la salud periodontal como buena, regular, o mala; dichos criterios subjetivos no permitían tener resultados comparables, por lo que fue necesario establecer índices periodontales (Russell, 1956; Rojo *et al.*, 2011). Cabe destacar que la periodontitis crónica es la forma más común de enfermedad periodontal destructiva y afecta parte importante de la población que rebasa los 35 años de edad (Cordero, 2007).

De los 268 pacientes estudiados, 58% (n=155) fueron mujeres y 42% (n=113) hombres (Figura 1). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Baena y colaboradores (2004) quienes realizaron un estudio en la cavidad oral de pacientes infectados y encontraron que el 59% fueron mujeres. Sin embargo Russell (1957) encontró que el estado de salud periodontal fue mejor en las mujeres que en los varones. Más tarde Waerhaug (1967) encontró mayor severidad de enfermedad periodontal en las mujeres que en los varones en un país en vías de desarrollo.

La edad de los pacientes estudiados en este trabajo osciló en el rango de 12 a 86 años; sin embargo el grupo de edad más frecuente fue el de 51-60 años (Figura 2). La prevalencia y severidad de la pérdida ósea aumenta con el incremento de la edad y se ha descrito que en algunas poblaciones todos sus miembros muestran cierta evidencia de pérdida ósea cuando alcanzan una edad intermedia (Burt, 1994). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Rojo y colaboradores (2011), quienes encontraron que existe una correlación positiva entre la severidad de la periodontitis y el incremento de la edad.

## 7.2 Identificación de microorganismos asociados a enfermedad periodontal.

Los microorganismos más frecuentes identificados en las muestras de las infecciones periodontales fueron las bacterias Gram positivas con un 59.3% (*Staphylococcus* spp. y *S. aureus*); la frecuencia de las bacterias Gram negativas fue 18.1% (*Escherichia coli* y *Klebsiella* spp.), mientras que el 22.6% correspondió al hongo (*Candida albicans*) (Figura 3). La elevada frecuencia de bacterias Gram positivas coincide con lo descrito por Sunde y colaboradores en el 2002, quienes investigaron la microbiota periapical de 36 dientes con periodontitis apical refractaria, donde las especies Gram positivas, entre ellas *S. aureus*, fue identificada en el 79.5% de las muestras. Es importante destacar que la placa dentobacteriana se conforma por bacterias colonizadoras primarias, como especies de *Actinomyces* y *Streptococcus*, y bacterias periodontopatógenas; las primeras cumplen un papel de equilibrio, al representar la mayor proporción en la placa dentobacteriana además de jugar un papel periodontobenéfico, ya que representan el eslabón puente de las especies colonizadoras y las periodontopatógenas, las cuales evitan el aumento en proporción de las bacterias patógenas, mientras que las patógenas son las principales causantes de periodontitis (Figuroa, 2008). Souto y colaboradores (2006) analizaron 600 cepas provenientes de 3 distintos orígenes: 200 cepas de sitios con enfermedad periodontal, 200 de sitios sanos de los pacientes con enfermedad periodontal y 200 de pacientes con encías sanas. Los resultados de estos autores mostraron que *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y otras bacterias patógenas “no orales” (*Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Enterococcus faecalis*) fueron identificadas en los sitios con enfermedad periodontal. Otros autores han aislado a *S. aureus* y *C. albicans*, entre otros microorganismos, de pacientes con enfermedad periodontal y en pacientes portadores de prótesis con o sin estomatitis protética atrófica (Smith *et al.*, 2001; Sunde *et al.*, 2002; Baena *et al.*, 2004).

### 7.3 Identificación de *S. aureus*

*S. aureus* fue identificado por PCR convencional mediante la amplificación de los marcadores cromosómicos *spa*, rRNA, *coa* y *nuc* (Fotografías 9-12). De los 268 pacientes con enfermedad periodontal, *S. aureus* se identificó en el 18.8% (n=50).

La detección de secuencias específicas de genes cromosómicos ayuda en la identificación de especies bacterianas. Nashev y colaboradores (2004) emplearon para la identificación de *S. aureus* los genes polimórficos *spa* (región X) y *coa*, así como la amplificación de partes específicas de los genes *nuc* y 23S rRNA en 44 cepas provenientes de narinas. Frénay y colaboradores (1996) analizaron la región X del gen *spa* para la tipificación epidemiológica de las cepas de MRSA. Brakstad y colaboradores (1992) emplearon la PCR para la amplificación del gen *nuc*, concluyendo que puede ser potencialmente utilizado para el diagnóstico rápido de infecciones por *S. aureus* mediante la prueba directa en muestras clínicas, incluidas muestras de pacientes con terapia antimicrobiana en curso. Hookey y colaboradores (1998) desarrollaron un procedimiento basado en la amplificación mejorada por PCR del gen de la coagulasa (*coa*), así como en el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en 85 cepas MRSA y encontraron diez patrones distintos de RFLP. También se desarrolló un método de PCR para la detección de *S. aureus* mediante la detección del gen 23S rRNA (Straub *et al.*, 1999).

El porcentaje de cepas aisladas de pacientes con enfermedad periodontal en este estudio (18%) es bajo comparado con el reportado por Kim y Lee (2015), quienes aislaron cepas de *S. aureus* en el 36.6% de muestras de la cavidad oral de pacientes con periodontitis. Por otro lado Toshkova y colaboradores (2001) identificaron 31 cepas de *S. aureus* aisladas de las fosas nasales anteriores de pacientes con infecciones cutáneas. La identidad de ambas cepas de cada par fue confirmada mediante la determinación del tamaño y el número de repeticiones de la región X del gen *spa* y mediante la determinación de polimorfismos génicos del gen *coa*, lo que demuestra la gran importancia de la permanencia nasal de *S. aureus* en el desarrollo de infecciones de la piel humana.

## 7.4 Identificación de genes que codifican enterotoxinas

En este estudio se detectaron genes que codifican toxinas y otros factores de virulencia en cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones periodontales, los cuales no han sido reportados con anterioridad por otros autores.

*S. aureus* es un patógeno versátil con diferentes factores de virulencia capaz de causar una amplia gama de enfermedades humanas, tanto sus productos estructurales como los que secreta desempeñan un papel en la patogénesis de la infección (Gordon & Lowy, 2008).

Las enterotoxinas estafilocócicas (SEA-SEJ) son responsables de la intoxicación alimentaria por *S. aureus* (Balaban & Rasooly, 2000). En este estudio los genes identificados con mayor frecuencia en las cepas fueron: *seg* con el 92% (n=46), *sei* con el 60% (n=30), seguido por *see* con 28% (n=14), *sea* 10% (n=5) y finalmente *sed* 4% (n=4) (Fotografía 13). Los genes *seb*, *sec*, *seh* y *sej* no se detectaron en este estudio (Cuadro 8).

Es importante mencionar que la frecuencia de los genes de enterotoxinas es muy variable; Corredor y colaboradores (2011) realizaron un estudio con 100 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes clínicos para determinar la prevalencia de los genes de toxinas que actúan como superantígenos. Ellos reportaron elevada frecuencia de *sec* (17%), *seb* (11%) y *sea* (10%), además de que el grupo de las enterotoxinas se presentó en un 44% del total de las cepas. Por otra parte Manfredi y colaboradores (2010) identificaron genes de enterotoxinas clásicas (*sea-see*) en cepas de *S. aureus* asociadas a intoxicaciones alimentarias provenientes de diferentes provincias de Argentina; encontraron el coco en el 53% de las cepas; asimismo encontraron baja frecuencia de los genes *sea*, *sed* y *see*. Los resultados de estos autores coinciden con la baja frecuencia de éstos encontrada en este trabajo, mientras que la frecuencia de genes de enterotoxinas fue mayor, con un 92%. Previamente Campbell y colaboradores (2008) reportaron elevada frecuencia de los genes *sea-sej*, en 56 cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en la piel, cabe destacar que los genes *seb* (8%) y *sec* (13%) se identificaron en menor porcentaje.

Los genes *seg* y *sei* detectados por PCR multiplex fueron los que mostraron alta frecuencia en este trabajo (92% y 60%). Otros autores han reportado alta frecuencia de estos genes respecto a los otros genes de enterotoxinas (Jarraud *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2003).

El análisis filogenético de genes de enterotoxinas indicó que *seg* y *sei* derivan potencialmente del grupo identificando como *egc* (Becker *et al.*, 2003).

## 7.5 Identificación de genes que codifican toxinas exfoliativas y la toxina del síndrome del shock tóxico

En el presente estudio la toxina exfoliativa ETA codificada por el gen *eta* se detectó en un 20% (n=10) de las cepas aisladas de enfermedad periodontal, el gen *etb* no fue identificado en ninguna cepa y la toxina del síndrome del shock tóxico (*tst*) se identificó en un 4% (n=2).

La toxina termoestable exfoliativa A está codificada por un fago, mientras que la toxina B es termolábil y está codificada por plásmidos. Estas toxinas actúan desmenuando los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin producir citólisis o inflamación; tienen actividad de serínproteasa, lo que desencadena la exfoliación. Las cepas productoras de una o ambas proteínas son responsables del síndrome de piel escaldada (Cervantes *et al.*, 2014). En este estudio se encontró un porcentaje bajo de cepas con los genes de estas toxinas. Mehrotra *et al.*, (2000), en un estudio realizado en 176 cepas de *S. aureus* aisladas de narinas, encontraron un 2% de cepas positivas para *eta* y 6% de cepas positivas para *tst*. En otro estudio se encontró 20.3% del gen *tst* y 1.2% de los genes para toxinas exfoliativas A y B (Becker *et al.*, 2003).

## 7.6 Identificación de genes que codifican otros factores de virulencia

La proteína serínproteasa V8 codificada, por el gen *v8*, puede unirse e inactivar las cadenas pesadas de todas las clases de inmunoglobulinas humanas modificando el fenotipo de fibronectina de *S. aureus* (McGavin *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2001). En este trabajo el gen *v8* se identificó en el 100% (n=50) de las cepas (Cuadro 8, Fotografía 16). Este porcentaje es elevado comparado con el 67%, identificado en cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes infecciones por Arvidson (1973) quien describió que este gen es de importancia para inactivar defensas del hospedero, contribuyendo de esta manera al daño tisular. Peacock y colaboradores (2002) identificaron por PCR al gen *v8* en el 96% de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con enfermedades invasivas; por otro lado,



Campbell y colaboradores (2008) identificaron el gen *v8* en el 75% de cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes con infecciones en la piel de americanos y en el 85% de africanos, mientras que Caballero (2014) identificó el gen *v8* en el 94.1% de cepas de *S. aureus* aisladas de catéter y narinas de pacientes de diálisis peritoneal.

El gen *arcA* (Fotografía 17) fue el segundo que presentó mayor frecuencia, con un 72% (Cuadro 8); este porcentaje es bajo comparado con lo reportado por Caballero en el 2014, quien lo encuentra en el 100% de las cepas provenientes de narinas y catéter. El gen *arcA* ayuda al crecimiento de la bacteria, a su supervivencia e inhibe la respuesta inmune, en medios de pH bajo a través de la vía de arginina deiminasa donde convierte la L-arginina a dióxido de carbono, ATP y amoníaco, es así como sobrevive la bacteria en condiciones anaerobias.

El gen *chp* (Figura 15) se identificó en el 60% de las cepas (n=30) (Cuadro 8). Este porcentaje coincide con el descrito por De Hass y colaboradores (2004), quienes estudiaron la actividad de *chp* en células de la cavidad peritoneal de ratones, y encontraron que aproximadamente el 60% de las cepas de *S. aureus* fue portadora de este gen, mientras que otros autores han encontrado porcentajes del 91.1% en cepas aisladas de narinas y de catéter (Caballero, 2014) y del 98% en cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes con infecciones en la piel (Campbell *et al.*, 2008). Se ha descrito que *chp* participa en la evasión y destrucción de defensas del hospedero, debido a que codifica una proteína inhibidora de la quimiotaxis de los neutrófilos (Postma *et al.*, 2004).

## 7.7 Identificación del operón *ica* que codifica para la biopelícula.

En este estudio el gen *icaA* (Fotografía 14) (Cuadro 8) se identificó en el 98% (n=49) de las cepas. *S. aureus* está relacionado con enfermedades infecciosas crónicas producidas por la formación de biopelículas, lo cual permite en primera instancia la colonización y posteriormente genera infecciones agudas incluyendo la caries dental y la infección periodontal, entre otras (Betancourth *et al.*, 2004). La formación de la biopelícula protege a la bacteria contra la actividad de los antibióticos (Gudiol *et al.*, 2009). Arciola y colaboradores (2001) identificaron el gen *icaA* en el 61% (n=14) de cepas aisladas de infecciones asociadas a catéter. Por otra parte Zmantar y colaboradores (2008) realizaron un estudio con 46 cepas

de *S. aureus* aisladas de infecciones auriculares e identificaron adhesinas relacionadas con la producción de biopelícula entre, ellas *icaA*, en el 78.2% de las cepas. Finalmente Morales (2013) identificó el gen *icaA* en el 100% (n=97) de las cepas de *S. aureus* provenientes de pacientes con diferentes infecciones nosocomiales.

## 7.8 Detección del gen *mecA* en cepas de *S. aureus*

En este trabajo se encontró que todas las cepas de *S. aureus* (n=50) aisladas de las infecciones periodontales fueron portadora del gen *mecA*. El gen *mecA* es el responsable de la resistencia a la meticilina en *S. aureus*, se encuentra localizado dentro del operón *mec* y forma parte del cassette cromosómico estafilocócico (*SCCmec*); codifica para una proteína alterada de unión a penicilina (PBP2a) (Castellano & P erozo, 201 0). Las cepas de *Staphylococcus* se han seleccionado como resistentes a todas las penicilinas y otros betalactámicos, (Velázquez, 2005). La aparición de cepas MRSA en la comunidad constituye un serio problema de salud para la población.

Las cepas MRSA tradicionalmente se han encontrado en las narinas (Cole *et al.*, 2001; Kluytmans & Wertheim, 2005); sin embargo, estudios recientes han demostrado que la garganta es un sitio muy común para la colonización, como lo demuestra un estudio realizado en narinas y garganta de pacientes, encontrando que el 12.4% de los pacientes estudiados fue exclusivamente portador de MRSA en la garganta (Mertz *et al.*, 2009). Por otro lado, se han encontrado porcentajes por arriba del 50% de cepas MRSA en la garganta (Nilsson y Ripa *et al.*, 2006; Partida *et al.*, 2010), o hasta del 100% en cepas aisladas de narinas en pacientes de hemodiálisis (Padilla *et al.*, 2014).

Resulta importante el estudio de patógenos dentro de la microbiota normal y transitoria de la boca, así como la capacidad de las bacterias orales para adquirir genes de resistencia a antibióticos a través de los diferentes mecanismos de transferencia genética (Carmona, 2004; Wilson, 2007). Los estudios de cepas MRSA en cavidad oral y en particular en enfermedad periodontal son escasos, por lo que nuestro trabajo aporta información sobre la importancia de cepas MRSA en la cavidad oral, ya que pueden llegar a desencadenar brotes epidémicos (Corne *et al.*, 2005).

## 7.9 Resistencia a los antibióticos

El 100% de las cepas de *S. aureus* fue resistente a la dicloxacilina (Figura 4). La dicloxacilina es un antibiótico perteneciente a los  $\beta$ -lactámicos que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana. Este porcentaje discrepa de lo descrito por Cornejo en el 2006, quien encontró que todas las cepas de *S. aureus* aisladas de fosas nasales fueron sensibles a la dicloxacilina, mientras que el 100% presentó resistencia a la penicilina.

Colín y Morales (2009) realizaron un estudio en el que analizaron la efectividad de distintos antimicrobianos contra *S. aureus* presentes en abscesos periapicales. Estos autores encontraron que el 6% de las cepas fue resistente a la cefalotina, mientras que el 97% fue resistente a los nitrofuranos. Aquí se describió que el 36% de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones periodontales fue resistente a la cefalotina (Figura 4). Kim y Lee (2015) determinaron la resistencia de cepas aisladas de enfermedad periodontal a los antimicrobianos. Ellos reportaron mayor frecuencia de cepas resistentes a ampicilina y penicilina (88% en ambos casos); y los antibióticos a los hubo menos cepas resistentes fueron tetraciclina (7%) y gentamicina (5%).

La presencia del gen *mecA* le confiere a *S. aureus* resistencia absoluta contra las penicilinas semisintéticas (metecilina y oxacilina) y cefalosporinas de primera y segunda generación, que se utilizan frecuentemente para combatir las infecciones por *S. aureus*. Además también les confiere resistencia a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo cefalosporinas de tercera, y cuarta generación y a los carbapenems (imipenem, meropenem). La resistencia conferida por *mecA* se extiende a otras familias antibióticas como las quinolonas y lincosamidas, lo que limita grandemente tratamiento terapéutico (Echevarría & Iglesias, 2003).

En los últimos decenios los antibióticos comúnmente prescritos para tratar los abscesos dentales agudos son amoxicilina, penicilina, metronidazol y eritromicina. Sin embargo, *S. aureus* se ha seleccionado como resistente a estos antibióticos (excepto el metronidazol) (Colín, 2009; Lewis *et al.*, 1995).

El incremento de cepas MRSA que ocasionan diferentes tipos de infecciones, incluyendo las periodontales, se ha convertido en un serio problema de salud mundial. Las cepas de *S.*

*aureus* portadoras de *mecA* pueden diseminarse fácilmente y ocasionar infecciones agudas entre la comunidad, debido a la elevada resistencia a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenem (Melzer *et al.*, 2003).

### 7.10 Patrones de asociación de los genes de virulencia y de *mecA* en las cepas de *S. aureus* aisladas de infección periodontal

Se obtuvieron 24 combinaciones diferentes de los genes que codifican factores de virulencia en asociación con *mecA* en las 50 cepas de *S. aureus* (Cuadro 9). Los resultados mostraron que la mayoría de los patrones se encontraron asociados con los genes *spa*, responsable de la adhesión a fibrinógeno, el gen *coa*, que es capaz de coagular el plasma humano, varias enterotoxinas, pero sobre todo el gen *icaA* asociado a la formación de la biopelícula, lo que permitiría que las cepas de *S. aureus* pudieran ocasionar infecciones periodontales crónicas y/o agudas, debido a que la biopelícula protegería a las bacterias contra la respuesta inmune del hospedero. Por otro lado es sorprendente encontrar que todas las cepas de *S. aureus* fueron portadoras del gen *mecA* (MRSA), situación que complicaría el tratamiento médico, debido a la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Aunado a estos genes, la presencia del gen serínproteasa *v8* en todas las cepas favorece la colonización por medio de la inactivación de defensas del hospedero, contribuyendo de esta manera al daño tisular. La elevada asociación de los marcadores de virulencia y de fenotipos de resistencia a los antibióticos demuestra la capacidad de las cepas para diseminarse y ocasionar otro tipo de infecciones, sobre todo en pacientes diabéticos o inmunodeprimidos.

También es importante mencionar que la mayoría de las cepas de *S. aureus* analizadas fue portadora simultáneamente de los genes *seg* y *sei* (Cuadro 9), lo cual coincide con lo descrito por otros autores (Jarraud *et al.*, 2001; Mempel *et al.*, 2003). Los genes *seg* y *sei* derivan potencialmente del grupo identificando como *egc* (Jarraud *et al.*, 2001; Mempel *et al.*, 2003). Sauer y colaboradores (2008) detectaron a los genes *seg* y *sei* en 51 de 100 cepas MRSA aisladas de pacientes hospitalizados en un hospital universitario de la República Checa. Otros autores han reportado la asociación de los genes *etb*, *seb*, *sec*, *seh* y *sej* en cepas de *S. aureus* provenientes de origen nasal (Mehrotra *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2003).

## 8. CONCLUSIONES

- En este estudio se encontró que los microorganismos *S. aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. se encontraron asociados a las lesiones periodontales de los pacientes estudiados.
- Las cepas de *S. aureus* aisladas mostraron resistencia a la mayoría de los antimicrobianos probados.
- Todas las cepas de *S. aureus* fueron portadoras del gen *mecA* que codifica para la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
- La elevada frecuencia de asociación de los distintos genotipos de virulencia involucrados en la adhesión celular, producción de toxinas e inhibición de la respuesta inmune en las cepas de *S. aureus* estudiadas, aunada a la multiresistencia de las cepas a los antibióticos, demuestra la capacidad de éstas para provocar infecciones agudas o crónicas en los pacientes estudiados.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Agarwal DS. 1967. Subcutaneous staphylococcal infection in mice. II. The inflammatory response to different strains of staphylococci and micrococci. *Br J Exp Pathol* 48:468-482.
2. Álvarez I, Ponce J. 2012. *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Rev Cubana Pediatr* 84:383-391.
3. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 39:2151-2156.
4. Arvidson S. 1973. Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. II. Isolation and characterization of an EDTA-sensitive protease. *Biophys Acta* 302:149-57.
5. Baena T, Moreno V, Franco F, Aldape B, Quindós G, Sánchez LO. 2004. Colonización por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* en pacientes portadores de prótesis dentales. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 10:27-39.
6. Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal Enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61:1-10.
7. Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C. 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol* 41:1434-1439.
8. Betancourth M, Botero JE, Rivera SP. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia médica* 35:34-39.
9. Burt BA. 1994 Periodontitis and aging: reviewing recent evidence. *J Am Dent Assoc* 125:273-278.
10. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. 1992. Detección de *Staphylococcus aureus* por amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa del gen *nuc*. *J Clin Microbiol* 30:1654-1660.
11. Bustos JA, Hamdan A, Gutiérrez M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 17:287-305.

12. Caballero AI. 2014. Diferentes combinaciones de marcadores de virulencia en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. UNAM FES Iztacala. Tesis para obtener el título de Biólogo. p.25.
13. Calander AM, Dubin G, Potempa J, Tarkowski. 2007. *Staphylococcus aureus* infection triggers production of neutralizing, V8 protease-specific antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 267–272.
14. Campbell SJ, Deshmukh HS, Nelson CL, Bae IG, Stryjewski ME, Federspiel JJ, Tonthat JT, Rude TH, Barriere SL, Corey R, Fowler VG Jr. 2008. Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J Clin Microbiol* 46:678–684.
15. Carmona T, Diz P, Limeres J, Outumuro M, Caamaño F, Fernández J, Vázquez E. 2004. Pautas de profilaxis antibiótica de Endocarditis Bacteriana, recomendadas por los odontólogos en España. *Med Oral* 9:56-62.
16. Castañón SC. 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Investigación en salud* 5:79-84.
17. Castellano MJ, Perozo AJ. 2010. Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera* 39:18-35.
18. Cervantes GE, García GR, Salazar SP. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Pat clínica* 61:28-40.
19. Cole AM, Tahk S, Oren A, Yoshioka D, Kim Y, Park A, Ganz T. 2001. Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1064–1069.
20. Colín L, Morales SW. 2009. Determinación de la efectividad de distintos antimicrobianos en contra de *S. aureus* en absceso periapical en pacientes que acuden a las clínicas de la FES Zaragoza durante el 2009. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. p. 34.
21. Cordero H. 2007. Aislamiento y cuantificación de bacterias de pigmentación negra en pacientes con periodontitis generalizada y localizada en pacientes que acuden a la clínica de admisión de la Facultad de Odontología de la UNAM. UNAM. Facultad de Odontología. Tesis para obtener el grado de Maestro en Odontología. p.10.

22. Corne P, Marchandin H, Jonquet O, Campos J, Bañuls A. 2005. Molecular evidence that nasal carriage of *Staphylococcus aureus* plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients. *Clin Microbiol* 43:3491–3493.
23. Cornejo EM. 2006. Determinación de la resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de fosas nasales de portadores asintomáticos. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Tesis para obtener el título de Biólogo. p. 30.
24. Corredor LF, Moncayo JI, Santacruz JJ, Álvarez A. 2011. Detección de genes de toxinas pirogénicas y toxinas exfoliativas en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* en Colombia. *Inv And* 55:126.
25. Degnan BA, Fontaine MC, Doebereiner AH, Lee JJ, Mastroeni P, Dougan G, Goodacre JA, Kehoe MA. 2000. Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect Immun* 68:2441-2448.
26. De Haas CJC, Veldkamp KE, Peschel A, Weerkamp F, Van Wamel WJB, Heezius ECJM, Poppelier MJG, K. P. van Kessel KPM, Van Strijp JAG. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. *J Exp Med* 199:687-695.
27. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13:16–34.
28. Echevarria J, Iglesias D. 2003. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered* 14:195-203.
29. Figueroa RR. 2008. La placa dentobacteriana como factor etiológico de la enfermedad periodontal. UNAM. Facultad de Odontología. Tesina para obtener el título de Cirujano dentista. p. 37.
30. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, Van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15:60-4.
31. Gordon RJ, Lowy FD. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46:350–359.
32. Gudíol F, Aguado JM, Pascual A, Pujol M, Almirante B, Miro JM, Cercenado E, Domínguez MA, Soriano A, Rodríguez J, Vallés J, Palomar M, Tornos P, Bouza E. 2009. Documento de



- consenso sobre el tratamiento de la bacteriemia y la endocarditis causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 27:105–115.
33. Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM. 2000. Protein A is the Von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96:2149-2156.
  34. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9:486-93.
  35. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. 1998. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol* 36: 1083–1089.
  36. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina G. 2001. *egc*, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 166:669-677.
  37. Jiménez JN, Correa MM. 2009. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *Iatreia* 22:147-158.
  38. Karlsson A, Saravia P, Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S. 2001. Decreased amounts of cell wall-associated Protein A and Fibronectin-Binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infect Immun* 69:4742- 4748.
  39. Kim GY, Lee CH. 2015. Antimicrobial susceptibility and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of patients with periodontitis. *J Periodontal Implant Sci* 45:223-228.
  40. Kluytmans JA, Wertheim HF. 2005. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 33:3-8.
  41. Lewis MA, Parkhurst CL, Douglas CW, Martin MV, Absi EG, Bishop PA, Jones SA. 1995. Prevalence of penicillin resistant bacteria in acute suppurative oral infection. *J Antimicrob Chemother* 35:785-791.
  42. Manfredi EA, Leotta GA, Rivas M. 2010. PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev Argent Microbiol* 42:212-215.

43. Martín JV, Díez O, Morales M, Batista N, Villar J, Claverie F, Méndez S. 2004. Simultaneous PCR detection of *ica* cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *Int Microbiol*. 7:63–66
44. Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. 2001. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 40:1049-1057.
45. McGavin MJ, Zahragka C, Rice K, Scott JE. 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun* 65:2621-2628.
46. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 38:1032-1035.
47. Melzer M, Eykyn SJ, Gransden WR, Chinn S. 2003. Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than Methicillin-Susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of british patients with nosocomial infection and bacteremia. *Clin Infect Diseases* 37:1453-1460.
48. Mempel M, Lina G, Hojka M, Schnopp C, Seidl HP, Schafer T, Ring J, Vandenesch F, AbeckD. 2003. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:306–309.
49. Mertz D, Frei R, Periat N, Zimmerli M, Battegay M, Flückiger U, Widmer AF. 2009. Exclusive *Staphylococcus aureus* throat carriage: at-risk populations. *Arch Intern Med* 169:172-178.
50. Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.
51. Morales NG. 2013. *Staphylococcus aureus*: caracterización fenotípica y detección molecular por PCR de producción de coagulasa (*coa*), de biofilm (*icaA*) y resistencia a antibióticos (*mecA*) en cepas aisladas de pacientes con infección nosocomial. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. UNAM Facultad de Química. p. 54.
52. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2009. Capítulo 21 *Staphylococcus y cocos Grampositivos relacionados*. Microbiología médica p.209-223.
53. Nashev D, Toshkova K, Isrina SO, Abdulwahed AH, Christoph L, Michael Z. 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiology Letters* 233:45–52.

54. Nilsson P, Ripa T. 2006. *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *J Clin Microbiol* 44:3334–3339.
55. O’Gara JP. 2007. *Ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation on in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 270:179-188.
56. Ogston A. 1881. Micro-organisms in surgical diseases. *The British Medical J* March 12.
57. O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA. 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* 90:3835-3850.
58. Padilla N. 2014. Caracterización de genes que codifican toxinas en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. UNAM FES Iztacala. Tesis para obtener el título de bióloga. p.34.
59. Paniagua GL, Monroy E, Vaca F, Rodríguez JR, Vaca S. 2014. Expression of enterotoxin-coding genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Mexican hemodialysis patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 13:55.
60. Paniagua GL, Monroy E, Vaca S. 2015. *Manual de identificación de Escherichia coli y Salmonella spp. en materia fecal*. Ed. UNAM pp 75.
61. Partida AH, Sainz T, Bustos J. 2010. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the anterior nares and throats of healthy carriers in a mexican community. *J Clin Microbiol* 48:1701-1705.
62. Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O’Neill, Day NPJ. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70:4987–4996.
63. Perkins S, Walsh EJ, Deivanayagam CCS, Narayana SVL, Foster TJ, Höök M. 2001. Structural organization of the Fibrinogen-binding region of the Clumping Factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 276: 44721–44728.
64. Pi B, Yu M, Chen Y, Yu Y, Li L. 2009. Distribution of the ACME-*arcA* gene among methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and identification of a novel ccr allotype in ACME-*arcA*-positive isolates. *J Med Microbiol* 58:731-736.

65. Postma B, Poppelier MJ, Van Galen JC, Prossnitz ER, Van Strijp JAG, De Haas CJC, Van Kessel KPM. 2004. Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol* 172:6994-7001.
66. Rams TE, Feik D, Slots J. 1990. Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* 5:29-32.
67. Reed SB, Wesson CA, Liou LE, Trumble WR, Schlievert PM, Bohach GA, Bayles KW. 2001. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect Immun* 69:1521.
68. Rivieri GR, Weisz KS, Adams DF, Thomas DD. 1991. Pathogen-related oral spirochetes from dental plaque are invasive. *Infect Immun* 59:3377-3380.
69. Rojo NR, Flores A, Arcos M. 2011. Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. *Rev Odontol Méx* 15:31-39.
70. Russell AL. 1956. A system of classification and scoring for prevalence surveys of periodontal disease. *J Dent Res* 35:350-359.
71. Russell AL. 1957. Some epidemiological characteristics of periodontal disease in a series of urban populations. *J Periodontol* 28:286-293.
72. Sauer P, Síla J, Stosová T, Vecerova R, Hejnar P, Vágnerová I, Kolár M, Raclavský V, Petrzelová J, Lovecková Y, Koukalová D. 2008. Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *J Med Microbiol* 57:403-410.
73. Schmitt CK, Meysick KC, O'Brien AD. 1999. Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg Infect Dis* 5:224-34.
74. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. 2001. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol* 50:940-946.
75. Souto R, Andrade AFB, Uzeda M, Colombo APV. 2006. Prevalence of non-oral pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 37:208-15.

76. Straub JA, Hertel C, Hammes WP. 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J Food Prot* 62:1150-1156.
77. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. 2002. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 28:304-310.
78. Toshkova K, Annemüller C, Lämmler C. 2001. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. *FEMS Microbiol Lett* 202:17-24.
79. Velázquez ME. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública Méx* 47:381-387.
80. Watts A, Ke D, Wang Q, Pillay A. 2005. *Staphylococcus aureus* strain that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differs in virulence. *Infect Immun* 73:3502-3511.
81. Waerhaug J. 1967. Prevalence of periodontal disease in Ceylon. Association with age, sex, oral hygiene, socioeconomic factors vitamin deficiency malnutrition, betel and tobacco consumption and ethnic group. Final report. *Acta Odontol Scand* 25: 205-231.
82. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM. 2007. Prevention of infective endocarditis. Guidelines from the american heart association. A guideline from the american heart association rheumatic fever, endocarditis, and kawasaki disease committee, council on cardiovascular disease in the young, and the council on clinical cardiology, council on cardiovascular surgery and anesthesia, and the quality of care and outcomes research interdisciplinary working group. *Circulation*. *J Am Dent Assoc* 138:739-745, 747-760.
83. Zendejas GS, Avalos H, Soto MY. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed* 25:129-143.
84. Zmantar T, Chaieb K, Makni H, Miladi H, Abdallah FB, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2008. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol* 48:308-314.